

---

# Bachelorarbeit

---

Herr  
**Oliver Hauser**

**Vergleichende Untersuchungen  
der Verfahren ISO 14189 und  
mCP nach  
Trinkwasserverordnung 2001 zur  
Bestimmung von *Clostridium  
perfringens* in Oberflächenwasser**

Mittweida, 2015



## **Bachelorarbeit**

---

# **Vergleichende Untersuchungen der Verfahren ISO 14189 und mCP nach Trinkwasserverordnung 2001 zur Bestimmung von *Clostridium* *perfringens* in Oberflächenwasser**

Autor:  
**Herr**

**Oliver Hauser**

Studiengang:  
**Biotechnologie/Bioinformatik**

Seminargruppe:  
**BI11w1-B**

Erstprüfer:  
**Professor Dr. Röbbbe Wünschiers**

Zweitprüfer:  
**Diplom Biologe Heiko Schulze**

weitere Betreuer:  
**M.Sc. Dipl.-Ing. (FH) René Kretschmer**

Einreichung:  
**Mittweida, 21. September 2015**

Verteidigung/Bewertung:  
**Mittweida, 2015**

**Bibliographische Beschreibung:**

Hauser, Oliver: Vergleichende Untersuchungen der Verfahren ISO 14189 und mCP nach Trinkwasserverordnung 2001 zur Bestimmung von *Clostridium perfringens* in Oberflächenwasser. - 2015. - 8, 42, 5 S. Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Mathematik / Naturwissenschaften / Informatik , Bachelorarbeit, 2015

**Englischer Titel**

Comparative studies on the determination of clostridium perfringens in surface water samples by ISO 14189 and mCP methods according to Drinking Water Ordinance 2001.

**Kurzbeschreibung:**

Die vorliegende Arbeit soll einen Überblick über den Nachweis des Bakteriums *Clostridium perfringens* in Rohwasserproben geben. Für die Identifizierung dieser Bakterienart dienen die Nachweismethoden nach ISO 14189 und mCP nach Trinkwasserverordnung 2001.

Des Weiteren werden die erforschten Ergebnisse der beiden Verfahren gegenüber gestellt und miteinander verglichen.

**Abstract:**

This these gives an overview about the determination of the bacterium clostridium perfringens in surface water samples.

The proof is based on the methods ISO 14189 and mCP according to drinking water ordinance 2001.

Finally the results are compared with each other.

## **Danksagung**

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, welche mich im Verlauf meines Bachelorstudiums und bei der Anfertigung dieser Bachelorarbeit unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt Herr Dipl. Biologe Heiko Schulze, der mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Praxis – und Bachelorarbeit in der Firma Südsachsen Wasser GmbH in Chemnitz zu bearbeiten. Ich danke Ihnen für Ihre tatkräftige Unterstützung bei der Bearbeitung dieses Themas.

Ich bedanke mich besonders bei meinen Kolleginnen Caro, Kerstin, Annette, Nicole und Anne, die mir die Arbeit im Labor erleichtert und mich mit ihrer Kompetenz unterstützt haben.

Ein letzter Dank gilt meinen Eltern und meinen Geschwistern. Sie haben mich in jeglicher Art und Weise unterstützt und standen mir jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Clostridien</i> .....	2
1.2 <i>Clostridium perfringens</i> .....	3
1.3 Gasbrand und weitere Erkrankungen.....	4
1.4 Nachweis von <i>Clostridium perfringens</i> .....	6
1.5 Rohwasser .....	7
1.6 Methoden zur Identifizierung von <i>Clostridium perfringens</i> .....	7
1.6.1 mCP – Methode .....	7
1.6.2 ISO 14189 – Tryptose – Sulfit - Cycloserin – Verfahren .....	8
1.6.3 Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen ISO 14189 und mCP .....	9
<b>2 Zielstellung .....</b>	<b>10</b>
<b>3 Material.....</b>	<b>11</b>
3.1 Chemikalien .....	11
3.2 Geräte .....	11
3.3 Medien .....	12
<b>4 Methoden .....</b>	<b>14</b>
4.1 Probenahme .....	14
4.2 Angabe zu untersuchten Wasserproben .....	14
4.3 Membranfiltration der Proben .....	14
4.4 Nachweis von <i>C. perfringens</i> mittels mCP – Verfahren .....	15
4.5 Nachweis von <i>C. perfringens</i> mittels ISO 14189 .....	16
4.6 Nachweis der sauren Phosphatase .....	16
<b>5 Ergebnisse.....</b>	<b>20</b>
5.1 Überblick über möglich auftretende Ergebnisse.....	20
5.2 Nachweis auf <i>C. perfringens</i> mittels mCP – Verfahren .....	20
5.3 Bedampfung der mCP – Platten nach der Inkubation.....	21

5.4 Nachweis von Sporenbildung durch <i>C. perfringens</i> auf mCP – Nähragar .....	22
5.5 Nachweis von <i>C. perfringens</i> nach ISO 14189.....	24
5.6 Berechnung der tatsächlich positiv <i>C. perfringens</i> Kolonien auf TSC – Medium.....	27
5.7 Nachweis von Sporenbildung durch <i>C. perfringens</i> auf TSC – Medium.....	29
5.8 Vergleich mCP – Verfahren und ISO 14189 .....	32
<b>6 Diskussion.....</b>	<b>35</b>
6.1 Nachweis von <i>C. perfringens</i> mit der mCP - Methode.....	35
6.2 Nachweis von <i>C. perfringens</i> Sporen mittels mCP – Methode .....	36
6.3 Nachweis von <i>C. perfringens</i> nach ISO 14189.....	37
6.3 Nachweis der <i>C. perfringens</i> Sporen nach ISO 14189 .....	38
6.4 Vergleich mCP – Verfahren und ISO 14189 .....	38
<b>7 Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>41</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>43</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>46</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung.....</b>	<b>51</b>

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Schemenhafte Beschreibung der mCP – Methode .....	18
Abbildung 2: Schemenhafte Beschreibung der ISO 14189 .....	19
Abbildung 3: Anzahl der positiven und negativen Versuchsergebnisse auf <i>C. perfringens</i> mit mCP - Methode.....	21
Abbildung 4: Verdächtige und bestätigte <i>C. perfringens</i> Kolonien .....	22
Abbildung 5: Sporenbildung von <i>Clostridium perfringens</i> auf mCP – Nähragarplatten .....	23
Abbildung 6: Verdächtige und bestätigte Sporenkolonien auf mCP – Medium .....	24
Abbildung 7: <i>Clostridium</i> - Nachweis mittels TSC – Nährmedien .....	25
Abbildung 8: Gesamtanzahl der verdächtigen und bestätigten Kolonien auf Nähragar und mCP – Medium.....	27
Abbildung 9: Verdächtige Anzahl an <i>C. perfringens</i> Kolonien und die Gesamtanzahl der bestätigten <i>C. perfringens</i> Kolonien .....	29
Abbildung 10: Sporenbildung auf TSC – Medium.....	30
Abbildung 11: Bestätigte Sporenkolonien auf mCP - und DEV - Agar .....	31
Abbildung 12: Anzahl an positiven und negativen Proben der mCP - Methode und der ISO 14189 .....	32
Abbildung 13: Untersuchte und bestätigte Kolonien nach mCP - Verfahren und ISO 14189 .....	33
Abbildung 14: Bedampfung der verdächtigen Kolonien mit Ammoniumhydroxid.....	46
Abbildung 15: Negativer Nachweis auf <i>Clostridium perfringens</i> .....	46
Abbildung 16: Positiver Nachweis auf <i>Clostridium perfringens</i> .....	47
Abbildung 17: Verdächtige <i>Clostridium perfringens</i> Kolonien auf TSC - Medium.....	47
Abbildung 18: Positiver Nachweis der übertragenen Subkulturen von TSC - Medium auf mCP - Agar .....	48
Abbildung 19: Positiver Nachweis auf das Vorhandensein von saurer Phosphatase .....	48
Abbildung 20: Negativer Nachweis auf das Vorhandensein von saurer Phosphatase ...	49



## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Serotypen von <i>C.perfringens</i> und ihre Bedeutungen.....	4
Tabelle 2: Gemeinsamkeiten und Unterschiede von ISO 14189 und mCP - Verfahren ..	9
Tabelle 3: Gesamtanzahl der untersuchten Wasserproben .....	17
Tabelle 4: Ergebnisse, welche nach der Durchführung auftreten können .....	20
Tabelle 5: Werte für die Berechnung der Gesamtzahl an Kolonien .....	28
Tabelle 6: Vergleich der Ergebnisse von mCP - Verfahren und ISO 14189 .....	34
Tabelle 7: Untersuchungsergebnisse .....	49

## **Abkürzungsverzeichnis**

<i>C. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
KBE	Koloniebildende Einheiten
mCP	Membran Clostridium perfringens
MO	Mikroorganismen
RW	Rohwasser
TrinkwV	Trinkwasserverordnung
TSC	Tryptose – Sulfit – Cycloserin

## **1 Einleitung**

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich Bakterien im Trinkwasser befinden. Laut Trinkwasserverordnung 2001 (TrinkwV 2001) § 4 Abschnitt 1 muss gewährleistet sein, dass der Genuss oder Gebrauch von Trinkwasser keinen Schaden auf die menschliche Gesundheit nimmt.

Des Weiteren dürfen im Trinkwasser keine Krankheitserreger in einer solchen Konzentration enthalten sein, in der sie die Gesundheit des Menschen gefährden könnten. (TrinkwV2001,§ 5, Abschnitt 1)

Bis 2001 wurden Bakterien, wie *Escherichia coli*, *Enterokokken* und andere coliforme Bakterien als sehr verlässliche Indikatoren für die fäkale Verunreinigung von Trinkwasser angesehen.

Eine Trinkwasserepidemie 1993 in Milwaukee, Wisconsin (USA), bei welcher ca. 400.000 Menschen an Cryptosporidiosis erkrankten, hat jedoch gezeigt, dass eine Desinfektion mit Chlor nicht ausreicht, um das Trinkwasser von krankheitserregenden Mikroorganismen (MO) zu befreien.

Solche MO können Parasiten, Viren oder Protozoen sein, welche Erkrankungen wie Diarrhö, Erbrechen, geringes Fieber hervorrufen können. Diese Symptome können zu einem Flüssigkeitsverlust im Körpers und zur Dehydrierung führen. [URL - 1]

Dieser Vorfall verdeutlicht, dass nicht nur Entwicklungsländer mit Kontaminationen von Trinkwasser zu kämpfen haben, sondern auch große Industrienationen, wie zum Beispiel die USA. Die Länder führen die Aufbereitung von Wasser mithilfe von Desinfektionsmitteln durch. Doch einige MO haben mit der Zeit eine Resistenz gegen diese Vorgehensweise entwickelt und können so nicht mehr aus dem Wasser entfernt werden.

Es gibt einige Ursachen für die fäkale Verunreinigung von Gewässern. Anfangen von einer Kontamination durch Abwässer, Zuflüsse kontaminierten Oberflächenwassers, undichte Rohrleitungen in verschmutzten Grundwässern, bis hin zu intensiven Tierhaltungen oder der Verbreitung von Gülle in Trinkwasser – Schutzgebieten. [3]

Seit dem Vorfall in den USA wird versucht, die Sicherheit des Trinkwasser in Hinsicht auf Parasiten, Viren oder Protozoen zu verbessern, da diese Arten von MO resistent gegenüber Desinfektionsmittel, wie zum Beispiel Chlor, sind. [URL - 1]

Auf der Suche nach sporenbildenden Bakterien, welcher fäkaler Herkunft sind, wurde das Bakterium *C. perfringens* gefunden.

*C. perfringens* besitzt die Fähigkeit, bei ungünstigen Umweltbedingungen Sporen ausbilden zu können, welche ähnlich umwelt – und chlorresistent sind, wie zum Beispiel Parasitendauerformen.

Laut der EU – Richtlinie „Qualitätsanforderungen an Wasser für den menschlichen Gebrauch“ sollten in Trinkwasser keine Parasitendauerformen enthalten sein, falls der Nachweis auf *C. perfringens* in 100 ml negativ ausgefallen ist.

Des Weiteren wird empfohlen, alle Gewässer zu untersuchen, welche aus Oberflächenwässern stammen oder von solchen beeinflusst werden. [3]

Ein für den Nachweis von *C. perfringens* genormtes Verfahren, welches mit einem Membran – Clostridium – Perfringens Agar (mCP) durchgeführt werden soll, ist in der der TrinkwV 2001 beschrieben. [2]

Eine weitere Methode zur Untersuchung von Trinkwasser auf *C. perfringens* wird in der internationalen ISO 14189 beschrieben. [1]

### **1.1 Clostridien**

*Clostridien* sind obligat anaerobe, grampositive, stäbchenförmige Bakterien der Familie *Clostridiaceae*, welche ubiquitär in der Umwelt, vorwiegend im Erdboden, Staub und Verdauungstrakt, von Mensch und Tier, vorkommen.

[URL - 5]; [Botzenhart & Feuerpfeil (2008)]

Diese MO zählen zu den Fermentern, welche in der Lage sind, Kohlenhydrate und andere organische Stoffe abzubauen. Alle Arten der *Clostridien* sind katalase negativ und fähig, bei ungünstigen Umweltbedingungen wie Hitze, Verschmutzungen, sauerstoffreiche Milieus, Endosporen auszubilden. [URL - 6]

Die einzelnen Unterarten der *Clostridien* rufen eine Reihe von schwerwiegenden Krankheiten, wie Botulismus (*Clostridium botulinum*), Tetanus (*Clostridium tetani*) oder Clostridien – Myositis, besser bekannt als Gasbrand (*Clostridium perfringens*), hervor.

Des Weiteren sind *Clostridien* an eiterbildenden Infektionen beteiligt. [URL - 5]; [Neuman,G. & Feucht, H.H (2010)]

## **1.2 *Clostridium perfringens***

Das Bakterium *Clostridium perfringens* wurde 1892 von W.H. Welch und G.H.F. Nuttall entdeckt und von Veillon und Zuber 1898 umbenannt. [Rodloff A.C. (2012)]

Dadurch, dass diese Bakterien im Verdauungstrakt von Mensch und Tier vorkommen, gelten sie als ideale Indikatoren für die Verunreinigung von fäkal belasteten Abwasser. Anders als die anderen Clostridienarten besitzt *C. perfringens* keine Begeißelung, welche der Fortbewegung dient.

Bei ungünstigen Umweltbedingungen bilden die Bakterien widerstandsfähige Endosporen aus, welche kurzzeitig in sauerstoffreichen Milieu oder unter extremen Bedingungen wie Hitze, Kälte überleben können.

Des Weiteren besitzen die Sporen eine Resistenz gegenüber Desinfektionsmitteln, weshalb es nicht möglich ist, diese Dauerformen mit Chlor zu beseitigen.

Falls sich die Umgebungsverhältnisse wieder stabilisieren, keimen die Sporen aus.

*C. perfringens* kommt in den Serotypen A, B, C, D und E vor. Diese Typen können aufgrund der unterschiedlich gebildeten Toxine, Alpha, Beta, Epsilon und Iota, voneinander unterschieden werden. [URL - 6]

Dabei sind die Serotypen A und C besonders für die Humanmedizin von Bedeutung, da sie die Erreger für Gasbrand (Typ A) und für Darmentzündungen (Typ C) sind.

Die verschiedenen Serotypen, ihre dazugehörigen Toxine und die human – und veterinärmedizinischen Bedeutungen, sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1: Serotypen von *C.perfringens* und ihre Bedeutungen**

Serotypen	Toxine				Humanmedizinisch bedeutsame Erkrankungen	Veterinärmedizinisch bedeutsame Erkrankungen
	$\alpha$	$\beta$	$\epsilon$	$\iota$		
<b>A</b>	+	-	-	-	Gasbrand (Gangrän mit Wundinfektion) Gastroenteritis (lebensmittelbedingt)	Durchfall (Fohlen, Ferkel, usw.) Nekrotisierende Enteritis (Geflügel)
<b>B</b>	+	+	+	-		Dysenterie bei Lämmern, Enteritis bei Kälbern und Fohlen
<b>C</b>	+	+	-	-	Nekrotische Enteritis (Darmbrand)	Nekrotisierende Enteritis bei Ferkeln, Lämmern, Fohlen
<b>D</b>	+	-	+	-	Gastroenteritis	Enterotoxämie bei Lämmern, Schafen
<b>E</b>	+	-	-	+		Enterotoxämie bei Kälbern

[Kehr (2010)]

### **1.3 Gasbrand und weitere Erkrankungen**

Das Bakterium *Clostridium perfringens* ist einer von vielen Gasbranderregern und ist für 60 – 80 % aller Gasbrandfälle verantwortlich. [Neumann, G. (2010)]

Aufgrund der guten chirurgischen Behandlung wurden in Deutschland nur noch 50 – 70 Gasbranderkrankungen registriert. [Hof, H. & Dörries, R. (2012)]

Eine Gasbranderkrankung wird durch den *C. perfringens* Typ A, welcher das Alpha - Toxin, eine membranzerstörende Lecithinase, ausbildet, ausgelöst.

Das Enzym weist ein aggressives Verhalten auf, und spaltet das membranständige Lecithin in die Bestandteile Phosphorylcholin und Diazylglyzerol.

[Hof, H. & Dörries, R. (2012)]

Eine Infektion der Wunde kann exogen, durch den Staub oder den Dreck aus der Umwelt, oder endogen, durch *Clostridien* der physiologischen Bakterienflora, entstehen. Die Inkubationszeit nach einer Infektion mit den Erregern liegt bei 3-5 Tagen.

Wunden, welche mit den Bakterien infiziert wurden, sind durch die CO<sub>2</sub> – Entwicklung stark gespannt und weisen eine rotbraune Verfärbung auf.

Beim Abtasten, auch Palpation genannt, ist oft ein Knirschen, Krepitation, festzustellen.

Häufig kann aus der Wunde ein Herauslaufen eines übelriechenden Sekretes beobachtet werden.

Des Weiteren sind starke Schmerzen, hohe Pulsfrequenzen, Fieber über 38 °C und Verwirrtheit die Folgen einer *Clostridien* – Infektion. [URL - 2]; [Rodloff, A.C.(2012)]

Bei einer Nichtbehandlung kommt es früher oder später zu einem Nierenversagen, bis hin zu einem septischen Schock mit tödlichem Ausgang.

Deshalb ist es von dringender Bedeutung, dass eine Gasbrandinfektion schnell diagnostiziert wird, da solch eine Erkrankung einen schnellen und letalen Verlauf aufweist. [[Neumann, G. (2010)]]

Auch bei Eiterbildungen kann das Bakterium *C. perfringens* beteiligt sein. Eine Gasentwicklung, wie sie bei einer Gasbrandinfektion auftritt, ist dabei nicht zu beobachten. Dagegen handelt es sich häufig um Mischpopulationen, welche aus *Clostridium perfringens*, *Enterobakterien* und anderen anaeroben Bakterien bestehen.

Eine intestinale Infektion kann durch das Toxin des Serotyps A ausgelöst werden. Eine Kontamination entsteht dabei häufig durch die Aufnahme von Fleisch (Geflügel) und anderen infizierten Fleischprodukten. Eine Lebensmitteltoxikation setzt jedoch voraus, dass sich in einem Gramm 10<sup>6</sup> Bakterien aufhalten.

Das darmangreifende Enterotoxin verursacht Übelkeit, Bauchkrämpfe und Durchfall. In der Regel, sind das Erbrechen und Fieber keine Symptome einer solchen Infektion.

Der Krankheitsverlauf klingt nach ca. 24 – 48 h rapide ab, weshalb dieser auch als harmlos einzustufen und eine spezielle medizinische Behandlung nicht nötig ist.

[Rodloff, A.C. (2012)]; [Hof, H. & Dorries, R. (2012)]

Dagegen ist eine Enteritis necroticans, auch als Darmbrand bezeichnet, eine sehr ernstzunehmende Krankheit, welche durch die Infektion mit einem *Clostridium perfringens* Stamm vom Typ C ausgelöst wird. Das gebildete Beta – Toxin sorgt für eine schwere nekrotisierende Infektion des Leerdarms, einem Teil des Dünndarms.

Diese Kontamination ist durch häufig durch einen letalen Verlauf gekennzeichnet.

[Rodloff, A.C. (2012)]

#### **1.4 Nachweis von *Clostridium perfringens***

Das Bakterium *Clostridium perfringens* wächst nur unter strikt anaeroben Bedingungen. Das Wachstumsoptimum liegt bei einem pH – Wert zwischen 5,5 - 8,0 und einer Temperatur von 20-50 °C. Die optimale Temperatur beträgt 45 °C. Unter günstigen Bedingungen beträgt die Generationszeit 30 Minuten.

Ein Wachstum kann bereits nach 8 – 10 stündiger Inkubation beobachtet werden. Die Inkubationszeit gilt nach 18 – 24 h als abgeschlossen.[Rodloff, A.C. (2012)]

Nach TrinkwV von 2001, sind Oberflächenwässer, von Oberflächengewässern beeinflusste Trinkwässer und oberflächennahe Grundwässer auf das Vorhandensein von *C. perfringens* zu untersuchen. Dabei dürfen in 100 ml untersuchten Wasser keine Bakterien enthalten sein. [2]

Als Oberflächenwasser wird das Wasser aus natürlichen oder künstlichen, oberirdischen Gewässern bezeichnet. Es kann als Rohstoff für die Trinkwasseraufbereitung verwendet werden und ist in der Regel nicht frei von organischen Substanzen. [URL - 3]



## 1.5 Rohwasser

Als Rohwasser wird ein unbehandeltes Wasser bezeichnet, welches aus einem Brunnen, einem Gewässer oder aus einem Uferfiltrat entnommen wird und das zur Gewinnung von Trinkwasser Verwendung findet.

In manchen Gebieten Deutschlands ist die Qualität des Rohwassers so gut, dass keine oder nur wenige Aufbereitungsschritte nötig sind.

Andererseits kann die Qualität der Rohwässer durch Verunreinigungen, wie Algenwachstum, beeinträchtigt werden, was mehrere aufwendige Reinigungsschritte zur Folge hat. [URL - 4]

## 1.6 Methoden zur Identifizierung von *Clostridium perfringens*

Im Rahmen des Nachweises und Identifizierung von *C. perfringens*, in Rohwässern und Zuflüssen wurden folgende Methoden angewandt:

### 1.6.1 mCP – Methode

Das mCP – Verfahren wird auf Grundlage der TrinkwV von 2001 durchgeführt.

Für die Identifizierung von *C. perfringens*, wurde 1979 von Bisson und Cabelli ein Membran – Clostridium – Perfringens Selektivnährboden verwendet. Dieses Nährmedium gilt zur schnellen und quantitativen Erfassung von *C. perfringens* aus verschiedenen Wasserproben.

Für die Differenzierung von *C. perfringens* kann das Fehlen der  $\beta$  – D – Glukosidase, die Fermentation von Saccharose und die Bildung einer sauren Phosphatase im mCP – Nährmedium genutzt werden.

Durch das nicht Vorhandensein des Enzyms  $\beta$  – D – Glukosidase ist das Bakterium *C. perfringens* nicht in der Lage, das im Nährboden enthaltene Inoxyl –  $\beta$  – D – Glukosid, zu spalten.

Die Fermentation der Saccharose senkt den pH – Wert ab und der pH – Indikator Bromkresolpurpur schlägt von purpur nach gelb um.

Das Ergebnis, für die Identifizierung solcher Bakterien, ist der charakteristisch opak gelbe Farbton, welchen die *C. perfringens* Kolonien annehmen.

Präsumtive *C. perfringens* Kolonien können aufgrund der vorhandenen sauren Phosphatase – Aktivität durch Bedampfung mit Ammoniumhydroxid getestet werden. Dabei verfärben sich die Kolonien von gelb zu rosarot. Die Erklärung für den

Farbumschlag gibt die Spaltung von Phenolphthalein – Diphosphat zu Phenolphthalein, durch das Enzym saure Phosphatase.

Die zu untersuchende Wassermenge, in der Regel 100 ml, wird dabei durch einen sterilen Membranfilter, mit einer Porengröße von 0,45µm, filtriert. Nach der Filtration wird der Filter auf die Nähragarplatte gelegt und unter anaeroben Bedingungen, bei einer Temperatur von  $44 \pm 1$  °C für  $21 \pm 3$  Stunden (h), inkubiert.

Nach der Inkubation werden alle gelben Kolonien, welche nach der Bedampfung, mit Ammoniumhydroxid, einen rosa oder roten Farbstoff aufweisen, gezählt.

Die Ausbreitung einer unerwünschten Begleitflora wird durch das im Nährmedium enthaltene D – Cycloserin und PolymyxinB – Sulfat verhindert. [4]

### **1.6.2 ISO 14189 – Tryptose – Sulfit - Cycloserin – Verfahren**

Das Verfahren nach ISO 14189 beschreibt die Untersuchung auf *C. perfringens* mittels Tryptose – Sulfit - Cycloserin Nähragar (TSC).

Ebenso wie das mCP – Verfahren wird der TSC - Nähragar zur Isolierung und Identifizierung von *C. perfringens* und anderen sulfitreduzierenden Bakterien, in Lebensmitteln und Wasserproben, verwendet.

Die auftretende Sulfitreduktion mit einer Schwarzfärbung der Kolonien, welche durch die Bildung von Eisensulfid beschrieben werden kann, wurde durch Watson und Blair etabliert.

Die im Nährmedium enthaltenen Stoffe fördern das Wachstum der Kolonien.

Das im TSC – Agar enthaltene D – Cycloserin hemmt das Vorkommen unerwünschter Begleitflora.

Die Membranfiltration wird nach der ISO 8199 durchgeführt. Der Membranfilter wird nach der Filtration auf dem TSC – Nährmedium, bei einer Temperatur von  $44 \pm 1$  °C und für  $21 \pm 3$  h, unter anaeroben Bedingungen inkubiert.

Daraufhin erfolgt die Auszählung der schwarzen, grauen, gelb – braunen, auch schwach sichtbaren, Kolonien. Falls die Anzahl der KBE größer 10 ist, werden zufällig mindestens 10 Kolonien ausgewählt und auf einen DEV – Nähragar übertragen.

Analog dazu werden die identischen Kolonien auf mCP – Nähragar überimpft. Dieses Verfahren dient zur Kontrolle und zur eindeutigen Identifizierung der Kolonien.

Die Subkulturen auf dem DEV - Agar werden für  $21 \pm 3$  h, bei einer Temperatur von  $36 \pm 2$  °C, inkubiert.

Die Kontrollkulturen auf dem mCP - Medium werden für  $21 \pm 3$  h, bei einer Temperatur von  $44 \pm 1$  °C, bebrütet.

Nach Ablauf der Inkubation werden gewachsene Kolonien auf dem DEV - Medium mithilfe einer sauren Phosphatase – Reagenz versetzt.

Ein positives Testergebnis wird durch eine dunkelbraune Farbentwicklung beschrieben.

Die gelbgefärbten Kolonien auf dem mCP – Medium werden mit Ammoniumhydroxid bedampft und weisen bei einer rosaroten Farbentwicklung ein positives Ergebnis auf.

[1]

### 1.6.3 Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen ISO 14189 und mCP

Die Unterschiede und Gemeinsamkeiten der beiden Untersuchungsverfahren auf *C. perfringens*, werden in folgender Tabelle dargestellt.

Tabelle 2: Gemeinsamkeiten und Unterschiede von ISO 14189 und mCP - Verfahren

	ISO 14189	mCP - Verfahren
<b>Dauer</b>	bis 48 Stunden	bis 24 h
<b>Farben der Kolonie</b>	schwarz, grau, gelbbraun	opak gelb
<b>Hemmstoffe für Begleitflora</b>	D – Cycloserin	D – Cycloserin, PolymyxinB-Sulfat
<b>Bestätigung der Phosphatase – Aktivität</b>	durch versetzen mit saurer Phosphatase Reagenz	durch bedampfen mit Ammoniumhydroxid
<b>Gemeinsamkeiten</b>	Verfahren zum Nachweis von <i>C. perfringens</i> Anaerobe Wachstumsbedingungen Identische Inkubationstemperaturen	

[Schneider, S. (2015)]

## **2 Zielstellung**

In dieser Bachelorarbeit sollte eine vergleichende Untersuchung der Verfahren ISO 14189 und mCP nach Trinkwasserverordnung 2001, zur Bestimmung von *Clostridium perfringens* in Oberflächengewässern, durchgeführt werden.

Um diese Umstellung von der mCP – Methode auf die ISO 14189 bewerten zu können, sollten verschiedene Rohwässer und Zuflüsse unterschiedlicher Herkunft auf das Bakterium *Clostridium perfringens* untersucht werden.

### **3 Material**

Die in dieser Arbeit aufgezählten Materialien und Chemikalien wurden nach den Vorschriften der ISO 14189 und ISO 8199 verwendet.

#### **3.1 Chemikalien**

- Rohwasser
- Zuflüsse
- Saure Phosphatase Reagenz
  - 1 – Naphtylphosphat – Mononatriumsalz 0,4 g
  - Fast Blue B Salz (o- Dianisidin Bis (diazotiert)  
Zinkdoppelsalz 0,8 g
  - Acetat Puffer 20 ml
    - Eisessig 0,3 ml
    - Natriumacetat 0,4 g
    - Deionisiertes Wasser 1000 ml
- Ammoniumhydroxid VWR

#### **3.2 Geräte**

- Membranfiltrationsanlage Satorius
- Membranfilter (Porengröße 0,45µm) Satorius
- Sterile Trichter (100ml) Satorius
- Bunsenbrenner
- Autoklav VARIOKLAV®
- Brutschrank WTC binder
- Sterile Pinzetten
- Anaerotest® Merck
- Anaero Gen Thermo Scientific
- Anaerobiertopf

### 3.3 Medien

• mCP - Agar:	OXOID
○ Tryptose	30,0 g/l
○ Hefeextrakt	20,0 g/l
○ Magnesiumsulfat	0,1 g/l
○ Saccharose	5,0 g/l
○ Bromkresolpurpur	0,04 g/l
○ Agar	15,0 g/l
○ L – Cysteinhydrochlorid	1,0 g/l
○ Phenolphthalein diphosphat	0,1 g/l
○ Indoxyl – $\beta$ – D – Glukosid	0,06 g/l
○ Cycloserin	0,4 g/l
○ Eisenchloridhexahydrat	0,09 g/l
○ pH-Wert	7,6 $\pm$ 0,2

[2]

• TSC - Agar	Merck
○ Tryptose	15 g/l
○ Hefeextrakt	5 g/l
○ Sojapepton	5 g/l
○ Natriumdisulfit	1 g/l
○ Ammoniumeisen(III) - citrat	1 g/l
○ D - Cycloserin	4 g/l
○ Agar	15,0 g/l
○ Wasser	1000 ml
○ pH – Wert	7,6 $\pm$ 2

[1]

• DEV - Nähragar	VWR
○ Pepton	5,0 g/l
○ Fleischextrakt	1,0 g/l
○ Hefeextrakt	2,0 g/l
○ Natriumchlorid	5,0 g/l
○ Agar	15 g/l
○ Destilliertes Wasser	1000 ml
○ pH – Wert	7,4 ± 0,2

## **4 Methoden**

Die Methoden wurden auf Grundlage der TrinkwV 2001 und der DIN EN ISO 14189 durchgeführt.

### **4.1 Probenahme**

Die Probenahme wurde durch Eintauchen der sterilen Probeflaschen an den jeweiligen Entnahmestellen vorgenommen. Daraufhin wurden die Proben kühl ins Labor transportiert.

Die Untersuchung der Wasserproben erfolgte am gleichen Tag der Probenahme oder am darauffolgenden Morgen. War dies der Fall, lagerten die Proben bei einer Temperatur von 5°C in einem Kühlschrank.

### **4.2 Angabe zu untersuchten Wasserproben**

Insgesamt wurden 77 Wasserproben untersucht. 60 dieser Wasserproben wurden auf vegetative Zellen und Sporen von *C. perfringens* untersucht.

17 von 77 Proben wurden in einem 60°C heißen Wasserbad erhitzt. Durch die Erhöhung der Temperatur konnten die vegetativen Zellen zerstört und die Wasserproben auf Sporen von *C. perfringens* untersucht werden. [1]

Die 77 Wasserproben, einschließlich der Sporenproben sind Rohwasserproben und Zuflussproben, welche aus sächsischen Talsperren stammen.

### **4.3 Membranfiltration der Proben**

Die Membranfiltration der Wasserproben wurde nach Vorschrift der ISO 8199 durchgeführt.

Vor Beginn der Filtration wurde die Anlage, durch Abflammen mittels Bunsenbrenner, desinfiziert. Die von der Firma Satorius zur Verfügung gestellten Membranfilter, mit einer Porengröße von 0,45 µm, wurden auf die Fritten aufgelegt und durch das Anlegen eines Vakuums festgesaugt.

Durch den Ansaugdruck lösten sich die Schutzpapiere der Filter ab und konnten mit einer sterilen Pinzette entfernt werden.



Daraufhin wurden sterile Trichter, mit einem Fassungsvermögen von 250 ml, auf die Anlage geschraubt und die 100 ml Wasserprobe filtriert.

Nachdem die Probe durchgelaufen ist, wurden die Abläufe geschlossen, um die Vakuumbedingungen aufzuheben und eine Zerstörung der Filter zu vermeiden. Die Membranfilter wurden anschließend auf die jeweiligen Nährmedien aufgelegt und weiter untersucht.

#### **4.4 Nachweis von *C. perfringens* mittels mCP – Verfahren**

Es wurde eine Analyse von 77 Wasserproben, auf das Bakterium *C. perfringens*, mit Hilfe des mCP – Verfahrens, durchgeführt.

Von diesen 77 Proben wurden 60 auf vegetative Zellen und Sporen untersucht. Die restlichen 17 Gewässerproben wurden einer Hitzebehandlung, bei 60 °C, unterzogen. Dadurch konnten die vegetativen Zellen zerstört und die Proben konnten auf das Vorhandensein von Sporen untersucht werden. [1]

Nach der Membranfiltration wurden die Filter auf den mCP – Agar gelegt und in einem Anaerobiotopf gestapelt. Um die optimalen Bedingungen, für das Wachstum von *C. perfringens*, zu schaffen wurden Anaero – Gen<sup>TM</sup> - Beutel in die Töpfe gelegt. Diese Päckchen absorbieren den im Behälter befindlichen Sauerstoff und bilden Kohlenstoffdioxid. Da die Reaktion bereits schon beim Öffnen des Beutels beginnt, muss der Anaerobiotopf schnell geschlossen werden. Um die anaeroben Verhältnisse im Topf zu überprüfen, wurde ein Anaeroteststreifen dazugelegt, welcher bei positiver Reaktion einen Farbumschlag von blau nach weiß aufzeigt.

Daraufhin wurden die Behälter, mit den enthaltenen mCP – Platten, bei einer Temperatur von  $44 \pm 1$  °C für  $21 \pm 3$  h inkubiert.

#### **4.5 Nachweis von *C. perfringens* mittels ISO 14189**

Es wurden, wie auch bei der mCP – Methode, 77 Wasserproben mittels des TSC – Verfahrens untersucht. Unter diesen 77 Wasserproben befinden sich 17 Proben, welche auf mögliche Sporen analysiert wurden.

Analog zur mCP – Methode wurden die Zellulosemembranfilter, nach Filtration von 100 ml Wasserprobe, auf den TSC - Agar gelegt.

Daraufhin wurden die Platten, unter anaeroben Bedingungen, in den Behältern eingelagert. Die Inkubation, in den Brutschränken, wurde bei einer Temperatur von  $44 \pm 1$  °C für  $21 \pm 3$  h durchgeführt.

Nach der Inkubation wurden die Platten auf ein mögliches Wachstum untersucht.

Falls schwarze, graue, gelbbraune Kolonien beobachtet werden konnten, wurden diese ausgezählt.

Wenn die Anzahl der KBE 10 überschritten hat, sollten mindestens 10 Kolonien zufällig ausgewählt und auf einen DEV - Agar und zusätzlich auf mCP – Medium übertragen werden.

War die Zahl, der gewachsenen Kolonien, kleiner oder gleich 10, mussten alle KBE auf den DEV - Nähragar und auf ein mCP – Medium überimpft werden.

Die Subkulturen wurden daraufhin nochmal einmal für  $21 \pm 3$  h, bei einer Temperatur von  $44 \pm 1$  °C, inkubiert.[1]

#### **4.6 Nachweis der sauren Phosphatase**

Nach dem Ablauf der Inkubationszeit wurden die gelben KBE auf den mCP – Medien gezählt.

Daraufhin wurde das mCP – Medium für 20 – 30 Sekunden, mithilfe von Ammoniumhydroxid, bedampft, um die Aktivität der sauren Phosphatase zu testen. Falls das Enzym existiert, kommt es zu einem Farbumschlag von gelb nach rosarot.

Die mCP – Nährmedien, welche mit Subkulturen der TSC – Platten beimpft wurden, müssen ebenfalls mit Ammoniumhydroxid bedampft werden, um die gewachsenen Kolonien als *C. perfringens* zu bestätigen. [2]

Die auf dem DEV Agar gewachsenen Kolonien wurden mit einer sauren Phosphatase – Reagenz versetzt. Falls das Enzym saure Phosphatase gebildet wurde, verfärbten sich die Kolonien dunkelbraun. [2]

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Anzahl der untersuchten Proben und deren Art.

**Tabelle 3: Gesamtanzahl der untersuchten Wasserproben**

<b>Art der Wasserprobe</b>	<b>Anzahl der untersuchten Proben mittels mCP - Verfahren</b>	<b>Anzahl der untersuchten Proben nach ISO 14189</b>
<b>Rohwasser (vegetative Zellen und Sporen)</b>	58	58
<b>Zuflussproben</b>	2	2
<b>Rohwasser (Sporen)</b>	17	17
<b>Gesamt</b>	77	77

Zum besseren Verständnis der durchgeführten Nachweisverfahren, sollen die nachfolgend aufgeführten Abbildungen dienen.

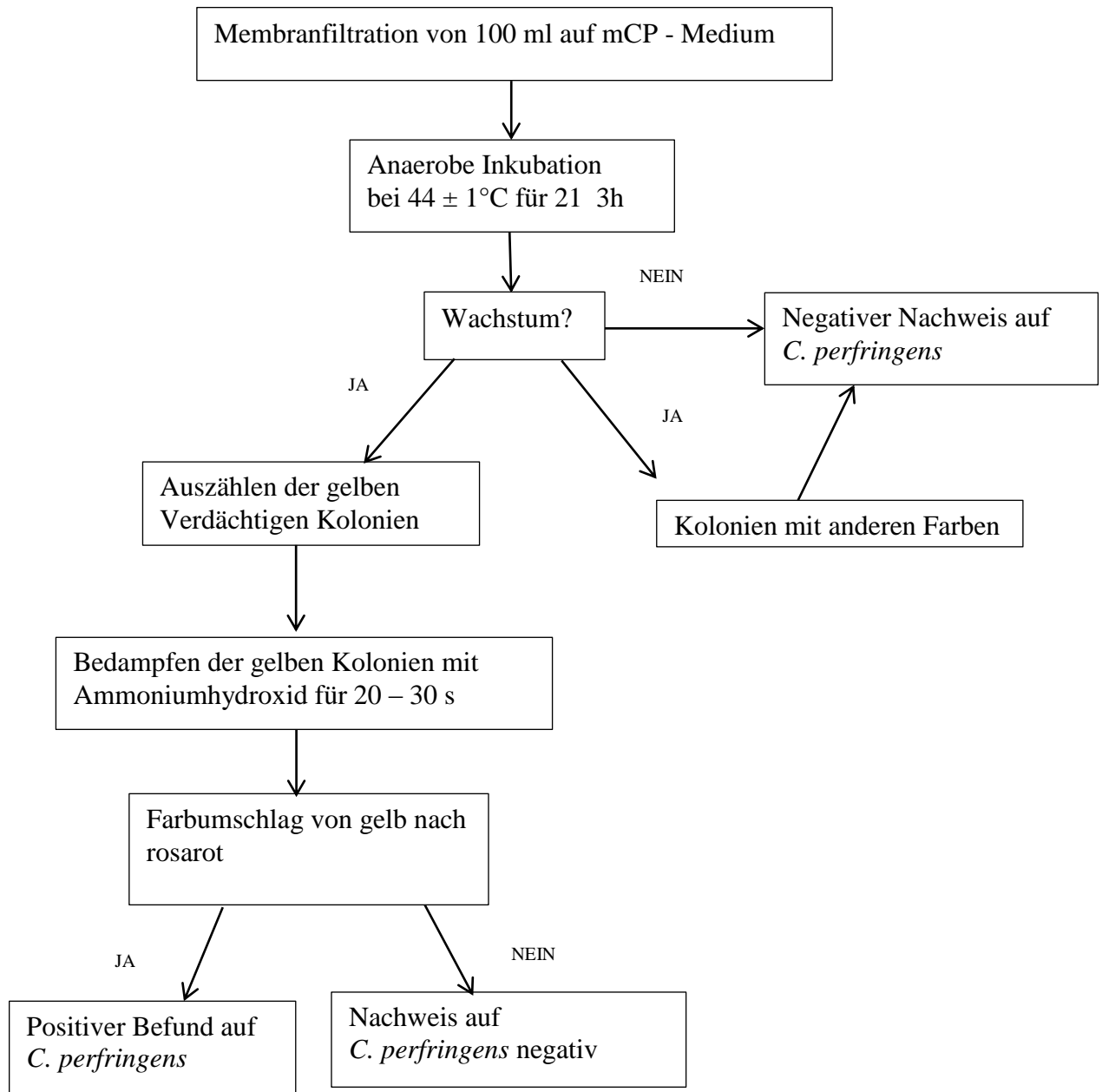


Abbildung 1: Schemenhafte Beschreibung der mCP – Methode

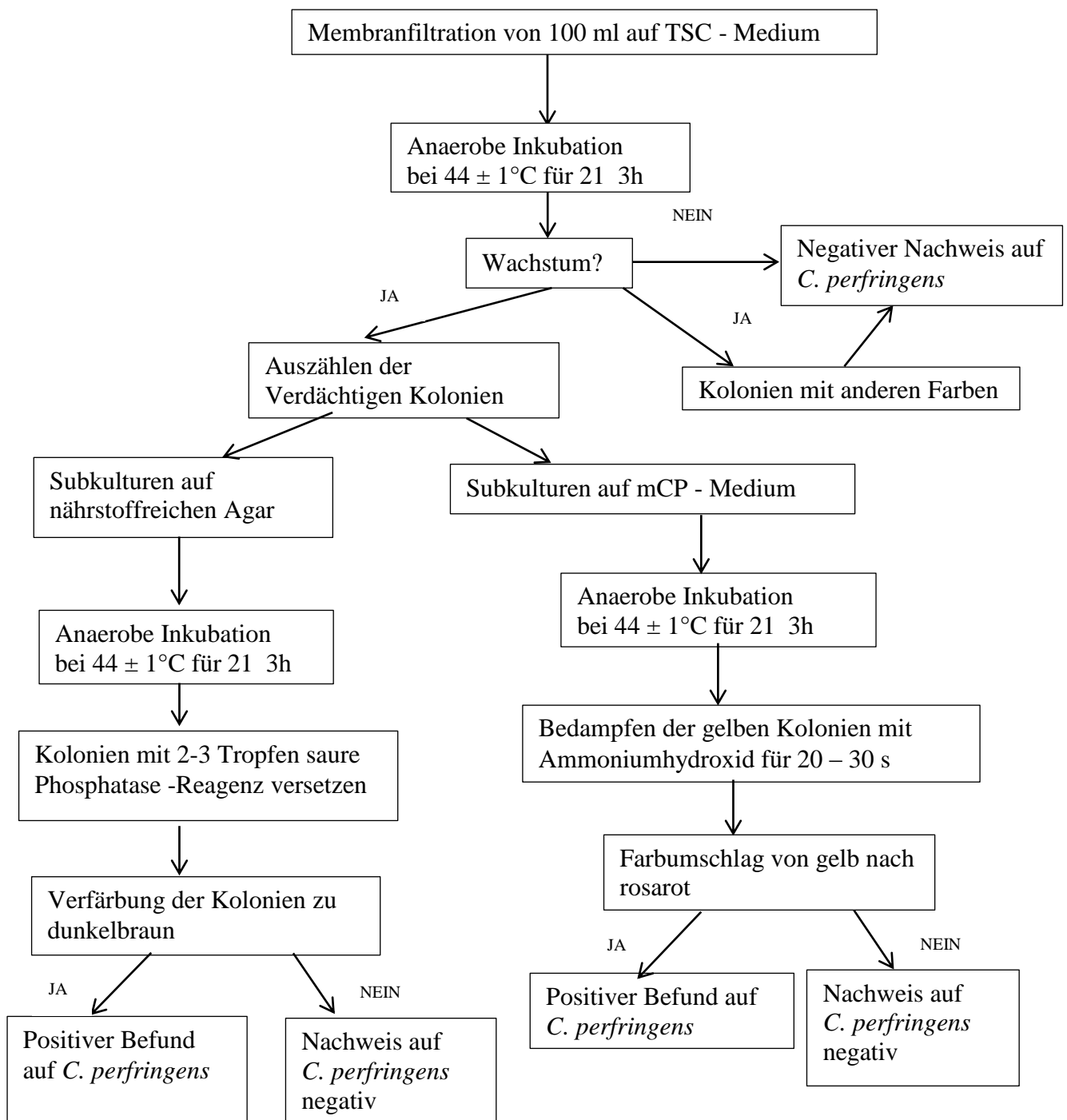


Abbildung 2: Schemenhafte Beschreibung der ISO 14189

## **5 Ergebnisse**

### **5.1 Überblick über möglich auftretende Ergebnisse**

Die möglichen Ergebnisse, welche in den vorangegangenen Methoden beschrieben wurden, sind in der nachfolgenden Tabelle 4 zusammengefasst.

**Tabelle 4: Ergebnisse, welche nach der Durchführung auftreten können**

<b><i>C. perfringens</i></b>	<b>Wachstum auf mCP – Medium</b>	<b>Wachstum auf TSC - Medium</b>	<b>Wachstum auf Nähragar</b>
<b>Größe der KBE</b>	3 – 4 mm	1-2 mm	2-5 mm
<b>Farbe der KBE</b>	Gelb	Schwarz	cremefarbig
<b>Form der KBE</b>	rund gewölbt	rund gewölbt	rund, flach
<b>Farbumschlag der KBE nach Analyse auf saure Phosphatase - Aktivität</b>	nach Bedampfen mit Ammoniumhydroxid: von gelb zu rosarot		nach versetzen mit saurer Phosphatase – Reagenz von cremefarbig zu dunkelbraun

### **5.2 Nachweis auf *C. perfringens* mittels mCP – Verfahren**

Mit dem mCP – Verfahren konnte das Bakterium *Clostridium perfringens* in 45 von 77 untersuchten Wasserproben nachgewiesen werden.

Zwei der untersuchten Wasserproben konnten sich von den anderen Proben abheben, da die untersuchte Koloniezahl > 100 betragen hat.

Die gewachsenen Kolonien wurden durch einen opakgelben Farbton charakterisiert. Des Weiteren besaßen die KBE eine Größe von 3-5 mm.

Dabei konnte festgestellt werden, dass die Größe der Kolonien, bei einer hohen Anzahl von KBE, stark variiert. Es konnten unterschiedlich große und kleine KBE beobachtet werden, welche sich dennoch strikt von den anderen Kolonien, durch eine glatte Umrandung, abgrenzten.

Insgesamt konnte ein Wachstum von 58,44 %, auf mCP – Medium, beobachtet werden. Das nachfolgend aufgeführte Diagramm gibt einen Überblick über die Anzahl der positiven und negativen Proben.

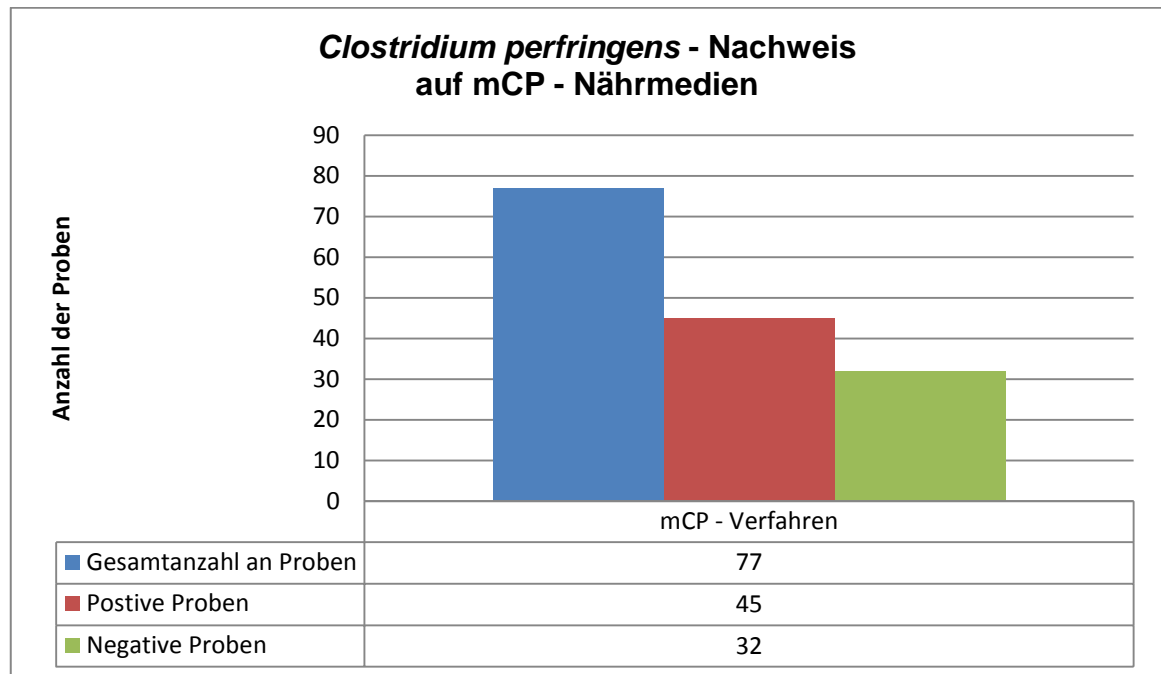


Abbildung 3: Anzahl der positiven und negativen Versuchsergebnisse auf *C. perfringens* mit mCP - Methode

### 5.3 Bedampfung der mCP – Platten nach der Inkubation

Die 45 Platten, welche ein positives Untersuchungsergebnis, auf *C. perfringens*, nachweisen konnten, sind mit einer unterschiedlich großen Anzahl an KBE besiedelt wurden.

Die Spanne der Kolonien reicht dabei von 153 verdächtigen Kolonien bis hin zu einer einzigen.

Insgesamt konnten auf den Platten 791 verdächtige Kolonien, welche einen opakgelben Farbton besessen haben, gezählt werden.

Damit eine eindeutige Identifizierung der Kolonien durchgeführt werden konnte, mussten die gewachsenen Bakterienkolonien, mithilfe von Ammoniumhydroxid, bedampft werden.

Nach der Begasung, welche 20 – 30 Sekunden in Anspruch genommen hat, wurden bei 673 KBE ein Farbwechsel von opak gelb zu rosarot beobachtet.

Die Größe und die Form, der Kolonien, haben sich dabei nicht verändert. Die verbliebenen 118 KBE konnten kein positives Testergebnis verzeichnen. Stattdessen behielten einige von ihnen den gelben Farbstoff. Bei anderen konnte ein Farbumschlag von gelb nach blau notiert werden.

Die Abbildung 4 zeigt die Verteilung der verdächtigen, bestätigten und nicht bestätigten Kolonien, welche auf dem mCP – Medium nachgewiesen werden konnten.

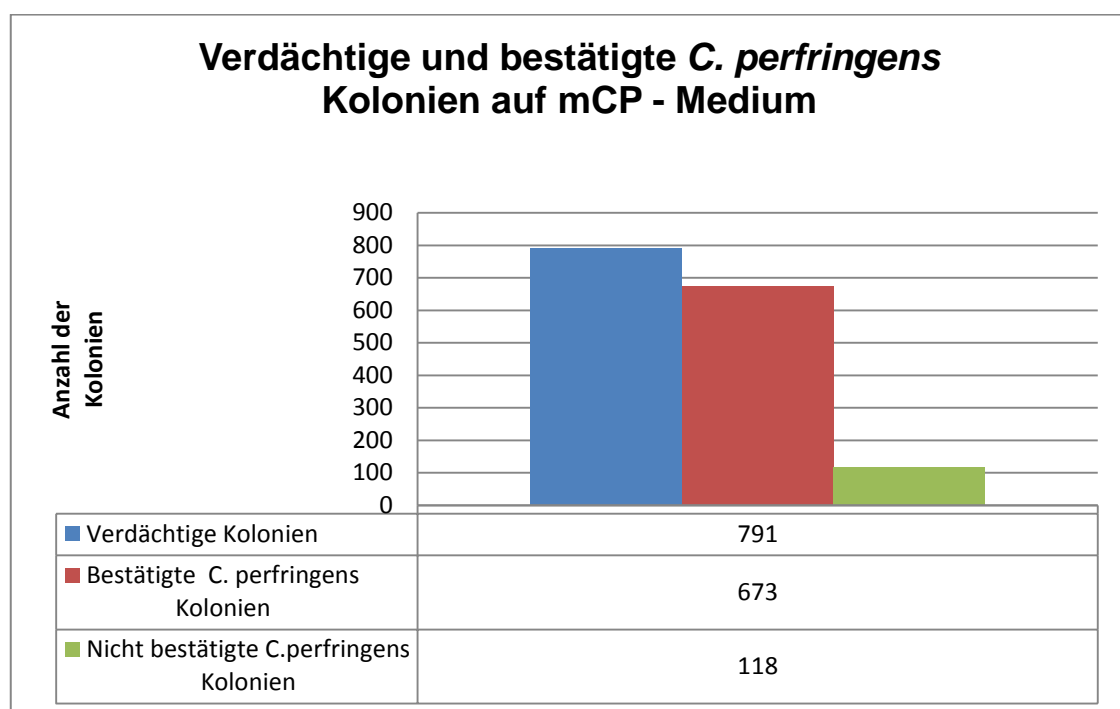


Abbildung 4: Verdächtige und bestätigte *C. perfringens* Kolonien

#### 5.4 Nachweis von Sporenbildung durch *C. perfringens* auf mCP – Nähragar

Insgesamt wurden 17 Wasserproben auf 60 °C erhitzt, um ein mögliches Sporenwachstum durch *C. perfringens*, auf mCP – Agar, festzustellen.

Nach Ablauf der Inkubation, konnte auf sechs Agarplatten ein Wachstum beobachtet werden.

Die Anzahl der gewachsenen KBE lag jedoch weit unter der Koloniezahl, welche bei den nicht vorbehandelten Proben nachgewiesen werden konnten.



In den restlichen 11 Wasserproben konnte, nach der Membranfiltration von 100 ml Wasser und anschließender Inkubation, kein Wachstum auf mCP - Platten festgestellt werden.

Das folgende Diagramm beschreibt die Anzahl der Proben und welche von ihnen ein positives Wachstum auf mCP – Agar verzeichnen konnten.

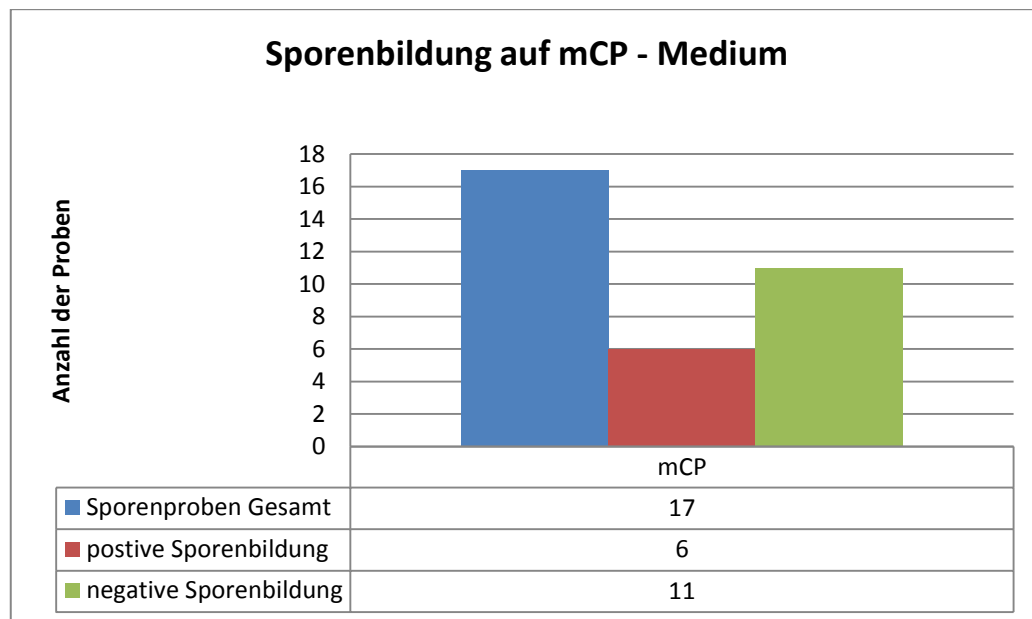


Abbildung 5: Sporenbildung von *Clostridium perfringens* auf mCP – Nähragarplatten

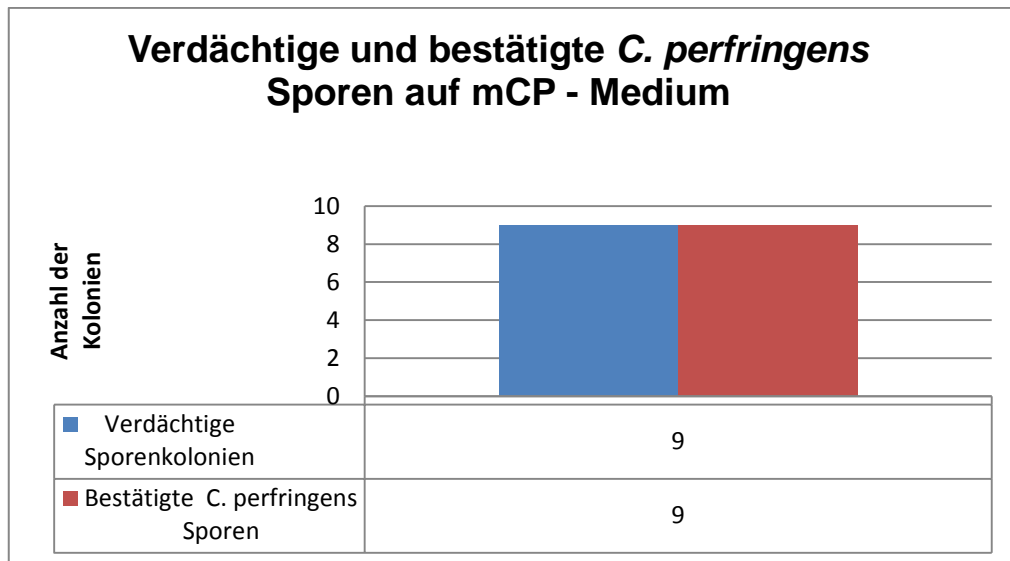
Auf den sechs Platten, welche ein positives Sporenwachstum zu verzeichnen hatten, konnten insgesamt 9 KBE betrachtet werden.

Diese Kolonien konnten durch einen opak gelben Farbton und einer Größe von 3 – 5 mm charakterisiert werden.

Des Weiteren besaßen sie eine leicht gewölbte Form und eine glatte Umrandung.

Durch die Bedampfung, mit Ammoniumhydroxid, sollte das Enzym saure Phosphatase, welches durch *C. perfringens* gebildet wird, nachgewiesen werden.

Bei allen Kolonien konnte eine Farbänderung von gelb nach rosarot festgestellt werden. Dieses Ergebnis wird anhand des folgenden Diagramms (Abbildung 6) veranschaulicht.



**Abbildung 6: Verdächtige und bestätigte Sporenkolonien auf mCP – Medium**

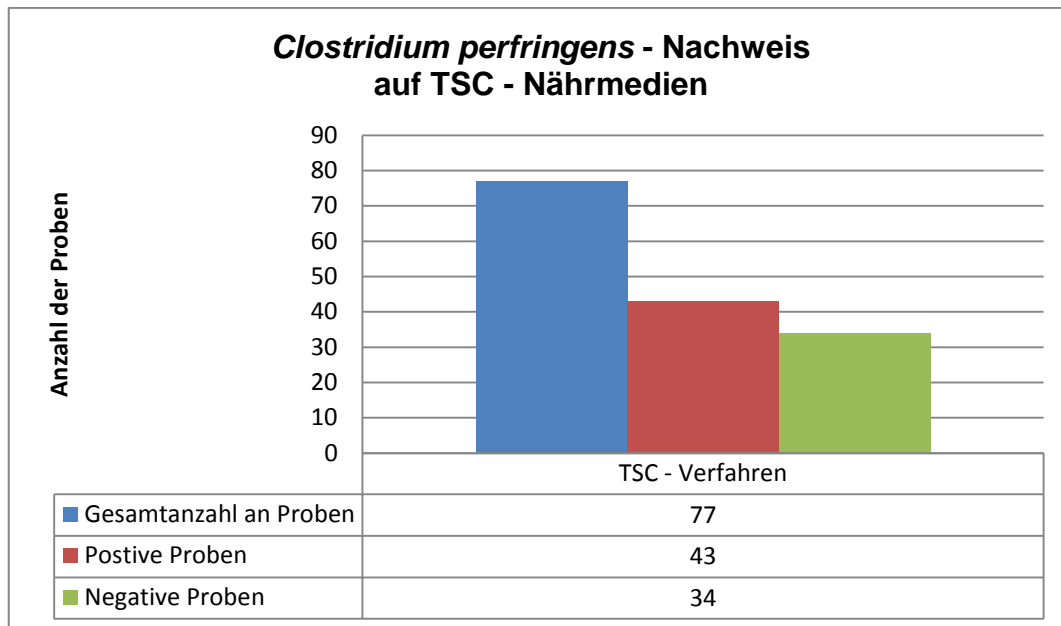
### **5.5 Nachweis von *C. perfringens* nach ISO 14189**

Parallel zu den Untersuchungen der Wasserproben mit mCP – Verfahren, wurden die Kontrollen, auf *C. perfringens*, mithilfe der ISO 14189 Vorschrift durchgeführt.

Dabei konnten von 77 untersuchten Proben, 43 positiv auf ein Wachstum von *C. perfringens* getestet werden.

Die verbliebenen 34 Nährmedienplatten konnten das Vorhandensein des Bakteriums, in den Wasserproben, nicht bestätigen.

Das nachfolgend aufgeführte Diagramm zeigt die Verteilungen der positiven und negativen Testergebnisse. Demzufolge wiesen 55,84 % der untersuchten Proben ein positives Wachstum auf *C. perfringens* auf.



**Abbildung 7: *Clostridium* - Nachweis mittels TSC – Nährmedien**

Insgesamt konnten auf den untersuchten TSC – Platten 610 verdächtige KBE gezählt werden. Diese wurden durch einen schwarzen, grauen oder bräunlichen Farbton charakterisiert.

Die Kolonien wiesen eine Größe von 1-2 mm auf und besaßen eine kreisförmige Geometrie mit glatter Umrandung.

Um die genaue Identifizierung der 610 KBE herausfinden zu können, wurden die Kolonien auf DEV - Agar und zur Kontrolle auf mCP – Nährmedium überimpft.

Dabei muss beachtet werden, dass nicht alle 610 KBE untersucht wurden. Nach der ISO 14189 war es nicht notwendig alle verdächtigen Kolonien auf DEV - Agar zu überführen.

Falls auf den TSC – Platten mehr als verdächtige KBE gewachsen sind, mussten mindestens 10 zufällig ausgewählte Kolonien auf das Kontrollmedium überimpft werden.

Bei einer Anzahl der KBE, welche kleiner oder gleich 10 betrug, wurde von allen gewachsenen Kolonien eine Subkultur erstellt. Insgesamt wurden 218 Kolonien auf DEV – Agar untersucht.

Nach Ablauf der Inkubation konnten auf beiden Medien ein Wachstum von KBE festgestellt werden.

Die Kolonien, welche auf dem DEV - Agar gewachsen sind, konnten durch einen gelblich, cremefarbenen Farbstoff beschrieben werden.

Des Weiteren konnte eine Größe von 3-4 mm, vergleichsweise so groß wie auf dem mCP – Medium, festgestellt werden.

Um die Art der Bakterienkolonien bestimmen zu können, welche auf dem DEV - Agar gewachsen sind, wurden diese mit einer sauren Phosphatase – Reagenz versetzt.

Diese Mixtur weist die Bildung des Enzyms saure Phosphatase, durch *C. perfringens*, nach.

Bei einem positiven Testergebnis verfärbten sich die Kolonien nach 3-4 min dunkelbraun, was bei 190 KBE der Fall war.

Analog dazu wurden die identischen 218 Kolonien auch auf mCP – Platten überführt.

Dieser Schritt diente als Kontrolle für den DEV – Agar.

Als Testergebnis konnte ein Wachstum von 218 Kolonien auf mCP – Medium festgestellt werden. Die KBE wiesen den für *C. perfringens* charakterlichen opakgelben Farbstoff und eine Größe von 3-5 mm auf.

Um die Kolonien letztlich genau identifizieren zu können, wurden die Platten mit Ammoniumhydroxid bedampft.

Dabei konnten bei 194 KBE ein Farbwechsel, von gelb zu rosarot, beobachtet werden.

Die Abbildung 8 gibt einen Überblick über die beschriebenen Testergebnisse.

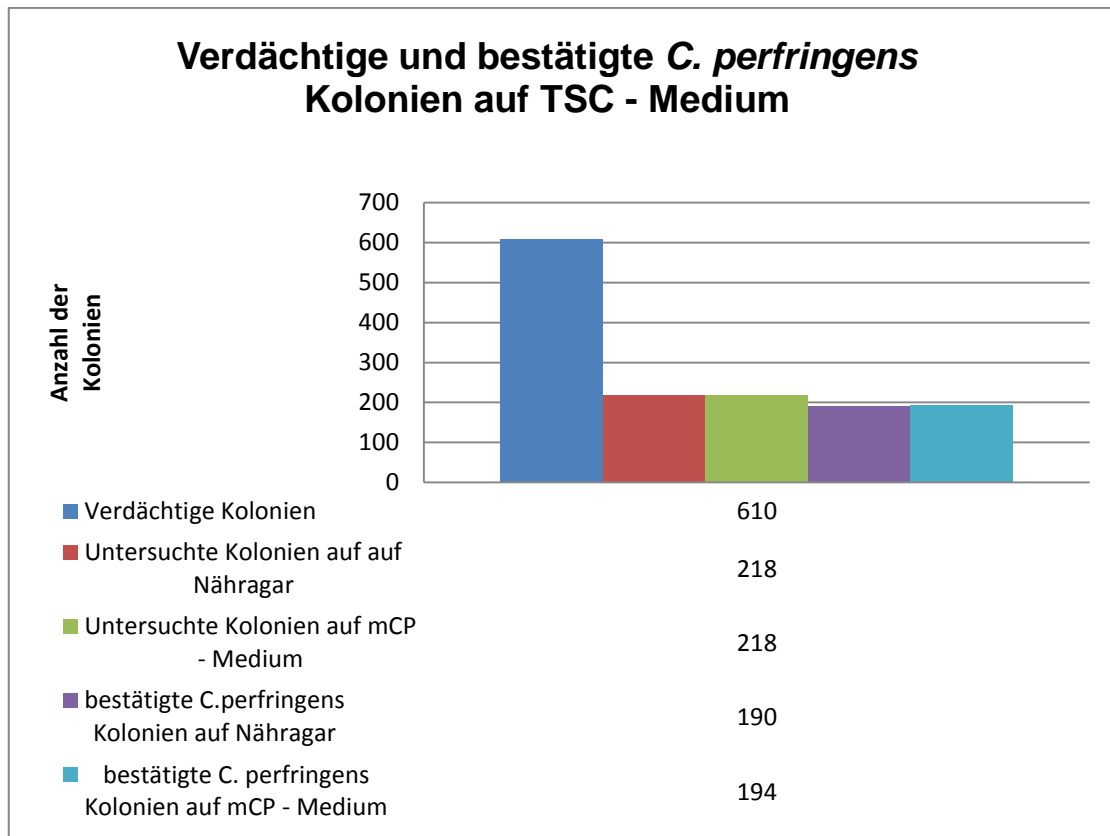


Abbildung 8: Gesamtanzahl der verdächtigen und bestätigten Kolonien auf Nähragar und mCP – Medium

## 5.6 Berechnung der tatsächlich positiv *C. perfringens* Kolonien auf TSC – Medium

Aufgrund der Tatsache, dass laut ISO 14189 nicht alle verdächtigen Kolonien auf DEV – Agar und mCP – Medium überprüft werden müssen, kann ein ordnungsgemäßer Vergleich der beiden Verfahren nicht durchgeführt werden.

Deshalb ist es notwendig, dass die positiv untersuchten KBE hochgerechnet werden, damit man die tatsächliche Gesamtanzahl der positiven *C. perfringens* Kolonien erhält. Wenn 89 verdächtige Kolonien gewachsen sind und die 10 untersuchten KBE als *C. perfringens* nachgewiesen werden konnten, können alle 89 Bakterienkolonien als *C. perfringens* identifiziert werden.

Die Hochrechnung wird für beide Kontrollmedien durchgeführt.

Die nachfolgend aufgeführte Tabelle und die daran angeknüpfte Rechnung dienen als Beispiel und sollen zum besseren Verständnis beitragen.

**Tabelle 5: Werte für die Berechnung der Gesamtzahl an Kolonien**

Verdächtige Kolonien	Untersuchte Kolonien		Bestätigte Kolonien		Gesamtanzahl an <i>C.perfringens</i> Kolonien	
	DEV - Agar	mCP - Agar	DEV – Agar	mCP - Agar	DEV – Agar	mCP – Agar
89	10	10	8	8	72,8	72,8
123	10	10	6	6	73,8	73,8

**Berechnung:**

$$\text{Gesamtanzahl} = \text{verdächtige Kolonien} * \frac{\text{bestätigte Kolonien}}{\text{untersuchte Kolonien}}$$

$$\text{Gesamtanzahl} = 89 * \frac{8}{10}$$

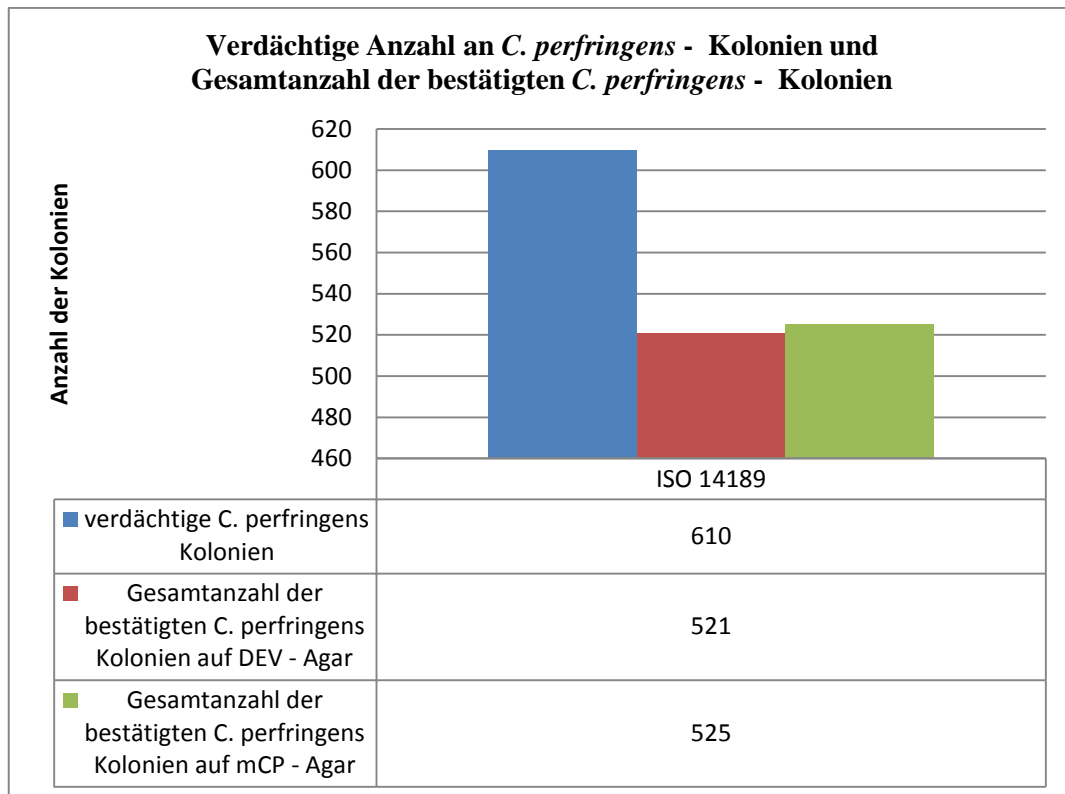
$$\underline{\text{Gesamtanzahl} = 72,8 \sim 73}$$

Werden die berechneten Gesamtanzahlen der Bakterienkolonien miteinander addiert, erhält man das jeweilige Ergebnis für die tatsächlich positiv gewachsenen *C. perfringens* Kolonien.

Für die verdächtigen Koloniezahlen, welche mit DEV – Agar untersucht wurden, ergibt sich eine Anzahl von 521 KBE.

Die Summe der hochgerechneten Koloniezahlen, welche mit mCP – Agar nachgewiesen wurden, beträgt 525 KBE.

Das nachfolgend aufgeführte Diagramm fasst die ermittelten Werte noch einmal übersichtlich zusammen.



**Abbildung 9: Verdächtige Anzahl an *C. perfringens* Kolonien und die Gesamtanzahl der bestätigten *C. perfringens* Kolonien**

Somit kann davon ausgegangen werden, dass ca. 85,41 % der verdächtigten Kolonien, mithilfe des DEV – Agars, positiv auf *C. perfringens* getestet wurden.

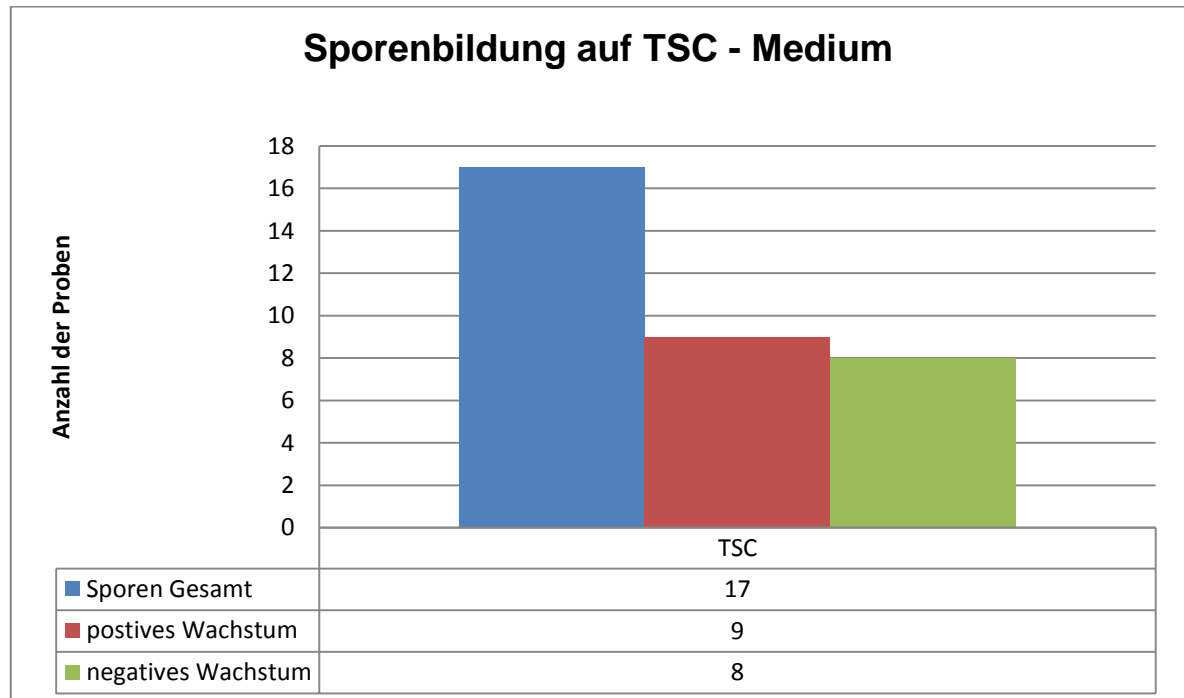
Dagegen konnten 86,01 % der verdächtigen KBE, mit dem mCP – Medium, als *C. perfringens* bestätigt werden.

### **5.7 Nachweis von Sporenbildung durch *C. perfringens* auf TSC – Medium**

Nach der Vorbehandlung, wobei 17 Wasserproben auf 60 °C erhitzt wurden, sollte der Nachweis auf eine mögliche mit dem Verfahren nach ISO 14189 durchgeführt werden.

Nach durchgeführter Membranfiltration von 100 ml Wasserprobe und der anschließenden Inkubation, unter anaeroben Bedingungen, konnten auf 9 TSC – Agarplatten ein positives Wachstum nachgewiesen werden.

Auf den restlichen Platten konnten keine Bakterienkolonien festgestellt werden (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Sporenbildung auf TSC – Medium**

Auf den positiv getesteten Platten konnten insgesamt 18 Bakterienkolonien gezählt werden. Die KBE waren schwarz, grau oder bräunlich gefärbt und wiesen eine Größe von 1-2 mm auf.

Die verdächtigen 18 Kolonien wurden auf DEV - Agar und parallel dazu auf mCP – Medium, zur Kontrolle, überimpft.

Nach der anaeroben Inkubation der Subkulturen konnten folgende Ergebnisse beobachtet werden.

Auf dem DEV - Agar konnte ein Wachstum der 18 Kolonien nachgewiesen werden. Dabei wurden diese, durch einen gelblich cremefarbenen Farbstoff und einer Größe von 3-4 mm, charakterisiert.

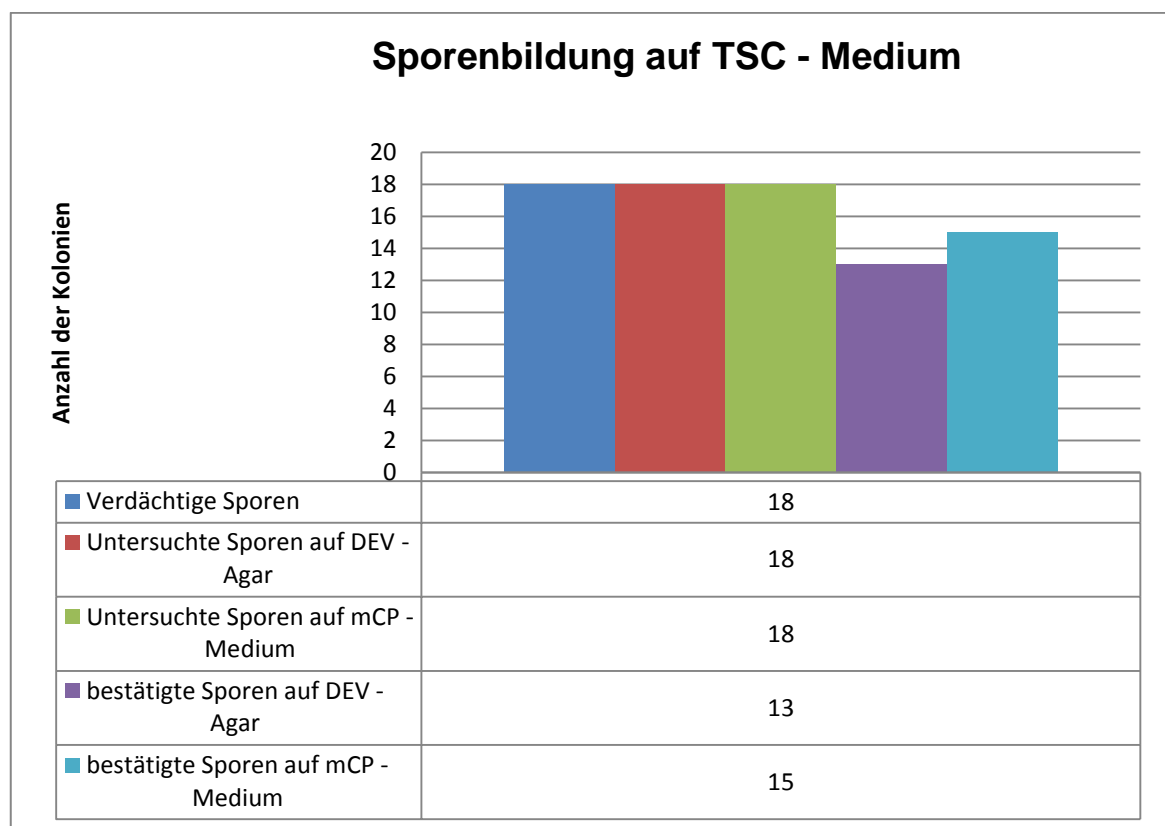
Nach Versetzen mit saurer Phosphatase – Reagenz, konnte bei 13 Kolonien ein Farbumschlag, von gelb nach dunkelbraun, beobachtet werden. Die anderen 5 Kolonien konnten keine Reaktion aufweisen.



Von den gleichen Kolonien, welche parallel auf mCP – Agar übertragen wurden, sind 18 KBE mit einem opakgelben Farbton gewachsen.

Nach der Begasung, mit Ammoniumhydroxid, konnte bei 15 von 18 verdächtigen Kolonien ein positives Testergebnis nachgewiesen werden. Bei diesen Bakterienkolonien wandelte sich der Farbton von gelb zu rosarot um.

Somit konnte mit der Methode nach ISO 14189 ein positives Testergebnis von 72,22 % auf DEV Nährboden und 83,33 % auf mCP – Nähragar erzielt werden.



**Abbildung 11: Bestätigte Sporenkolonien auf mCP - und DEV - Agar**

## 5.8 Vergleich mCP – Verfahren und ISO 14189

Die nachfolgend aufgeführten Diagramme zeigen einen Vergleich zwischen den beiden Verfahren.

Dabei werden die ermittelten Werte, für beide Verfahren, gegenüber gestellt. Die Abbildung 11 beschreibt die positiven, auf *C. perfringens* untersuchten, Wasserproben. Von 77 untersuchten Wasserproben wurden 45 Proben mit dem mCP – Verfahren positiv auf *C. perfringens* getestet.

Mithilfe des ISO 14189 Verfahrens wurden 43 Platten mit *C. perfringens* besiedelt. Prozentual entspricht das bei der mCP Methode 58,44% und nach ISO 14189 basierenden Verfahren 55,84% an positiven Proben (Abbildung 12).

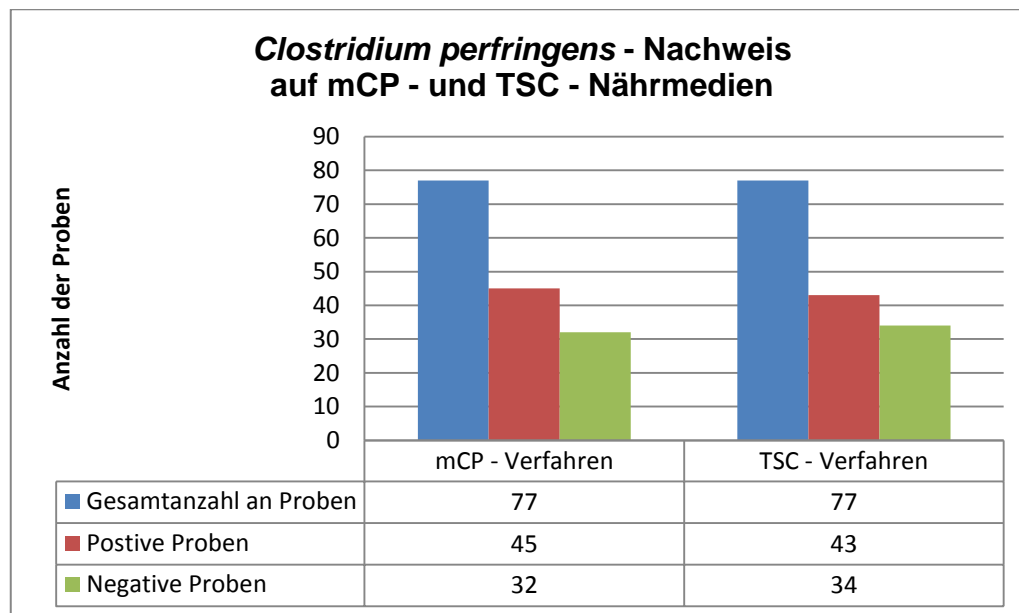


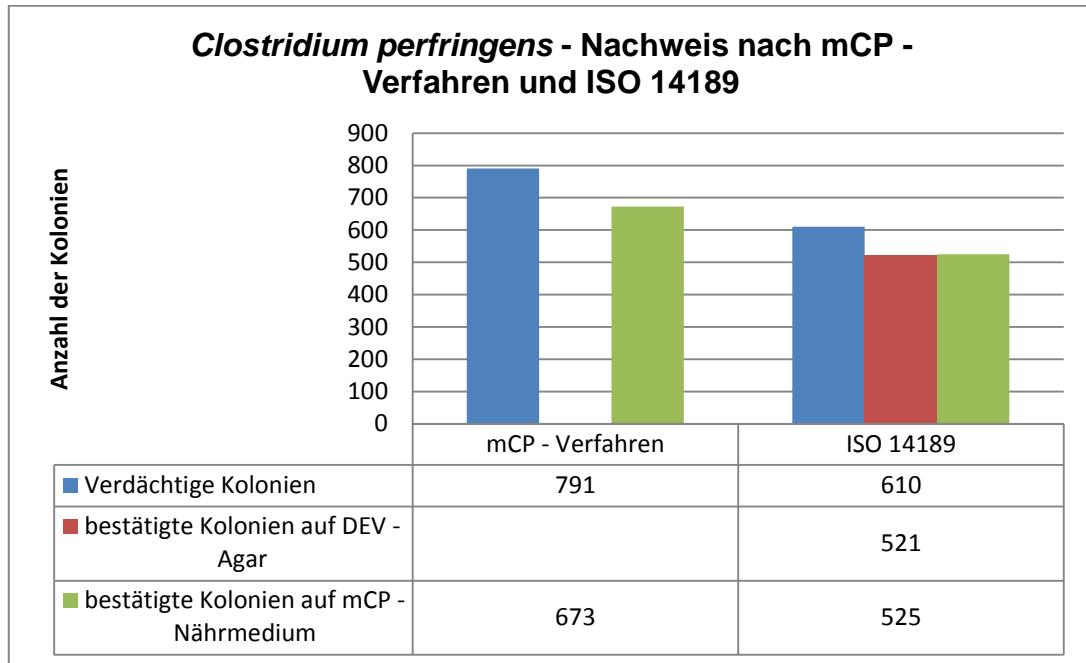
Abbildung 12: Anzahl an positiven und negativen Proben der mCP - Methode und der ISO 14189

Mit dem mCP – Medium, basierend auf TrinkwV 2001, konnten 791 verdächtige Kolonien nachgewiesen werden, wovon 672 KBE positiv als *C. perfringens* Kolonien bestätigt wurden.

Mithilfe der ISO 14189 wurden 610 verdächtige Kolonien gezählt.

Durch die Kontrolle mit DEV – Agar und mCP – Medium, konnten nach Hochrechnung der bestätigten Kolonien ca. 521 und 525 KBE als *C. perfringens* identifiziert werden.

Das nachfolgende Diagramm (Abbildung 13) stellt die ermittelten Werte, nach Hochrechnung der bestätigten Kolonien auf die Gesamtanzahl, gegenüber und ermöglicht somit einen besseren Überblick.



**Abbildung 13: Untersuchte und bestätigte Kolonien nach mCP - Verfahren und ISO 14189**

Die nachfolgende Tabelle gibt eine Zusammenfassung der Ergebnisse, welche mit den unterschiedlichen Verfahren ermittelt werden konnten.

**Tabelle 6: Vergleich der Ergebnisse von mCP - Verfahren und ISO 14189**

	<b>mCP – Verfahren</b>	<b>ISO 14189</b>	
		<b>DEV</b>	<b>mCP</b>
<b>Untersuchte Wasserproben</b>	77	77	77
<b>Positive Wasserproben</b>	45	43	43
<b>Verdächtige Kolonien</b>	791	610	610
<b>Untersuchte Kolonien</b>	791	218	218
<b>Bestätigte Kolonien (hochgerechnet)</b>	673	521	525
<b>Positiver Nachweis der Kolonien in %</b>	85,08	85,41	86,01
<b>Sporenuntersuchung</b>	17	17	17
<b>Positive Sporenproben</b>	6	9	9
<b>Verdächtige Sporen</b>	9	18	18
<b>Positiver Nachweis auf Sporen</b>	9	13	15
<b>Positiver Nachweis in %</b>	100%	72,22	83,33

## **6 Diskussion**

Die unter Kapitel 5 erfassten Ergebnisse des mCP – Verfahrens und der ISO 14189 zur Bestimmung von *C. perfringens*, bilden die Grundlage für die anschließende Diskussion.

### **6.1 Nachweis von *C. perfringens* mit der mCP - Methode**

Von 77 untersuchten Wasserproben konnten 45 positiv auf das Bakterium *C. perfringens* getestet werden.

Mithilfe des mCP – Verfahren wurden auf dem mCP – Nähragar insgesamt 791 präsumtive *C. perfringens* KBE gezählt.

Durch die Fermentation der im Nährboden enthaltenen Saccharose, wird eine Säure gebildet, welche einen Farbumschlag des pH – Indikators Bromkresolpurpur, von purpur nach gelb, verursacht. Diese Farbentwicklung ist charakteristisch für das Wachstum von *C. perfringens* auf mCP – Nährmedien. [4]

Durch die Bedampfung der Kolonien, mit Ammoniumhydroxid, wurden letztlich 673 KBE als *C. perfringens*, welche sich aus vegetativen Zellen und Sporen zusammensetzen, identifiziert.

Das Ammoniumhydroxid weist die Bildung des Enzyms saure Phosphatase nach, in dem sich die opak gelben Kolonien rosa verfärben. Diese Farbentwicklung ist auf die Spaltung des im Nährboden Phenolphthalein – Diphosphat zu Phenolphthalein zurückzuführen. [4]

Der Anteil an positiv nachgewiesenen *C. perfringens* Kolonien ist mit 85,08% um einiges höher als die negativ getesteten KBE, welche einen Wert von 14,91 % aufweisen.

Der Nachweis der sauren Phosphatase ist ein wesentlicher Bestandteil bei der Identifizierung von *C. perfringens*. Andere Clostridienarten können ebenfalls durch eine opak gelbe Farbentwicklung auf mCP – Medium charakterisiert werden.

Sie sind jedoch nicht in der Lage, das Enzym auszubilden und behalten nach der Bedampfung mit Ammoniumhydroxid ihre gelbe Farbe.

Zwei untersuchte Wasserproben zeigen ein erhöhtes *C. perfringens* Wachstum auf den mCP – Medien. Das hängt mit der Herkunft der Wasserproben ab, welche in diesen beiden Fällen aus Zuflüssen gewonnen werden konnten.

Zuflüsse besitzen in der Regel eine schlechtere Qualität als Rohwässer, da sie jede Menge Partikel, organische und anorganische Substanzen aus der Umgebung aufnehmen können. Des Weiteren können Fäkalien von Tieren in die Zuflüsse eingespült werden, was eine Beeinträchtigung der Wasserqualität zur Folge hat.

Die Qualität der Rohwässer wird durch die Höhe der Entnahmestelle bestimmt. Das hängt damit zusammen, dass sich das Wasser in Talsperren anstaut und sich somit enthaltene Partikel absetzen können. Das Wasser klärt sich in gewissem Maße von selbst. [7]

Algenwachstum kann die Qualität der Rohwässer in Talsperren ebenso beeinträchtigen. Das kann damit erklärt werden, dass die Algenbiomasse im Tiefenwasser der Talsperren, unter Sauerstoffverbrauch, zersetzt wird und sich Stoffe ausbilden können, welche für die schlechte Qualität verantwortlich sind. [URL - 8]

## **6.2 Nachweis von *C. perfringens* Sporen mittels mCP – Methode**

Durch das Erwärmen von 17 Wasserproben, auf 60 °C, wurden die darin enthaltenen vegetativen Zellen abgetötet.

Mithilfe des mCP – Verfahrens konnten in 6 Wasserproben *C. perfringens* Sporen nachgewiesen werden. Der Anteil der positiv getesteten Proben ist sehr gering und beträgt mit 35,29 % weniger als die Hälfte.

Die Reaktionen, welche die Sporen auf den mCP – Nährböden auslösen, sind identisch mit denen der vegetativen Zellen. Des Weiteren können die Kolonien nicht voneinander unterschieden werden, da sie die gleiche Form, Größe und Farbentwicklung besitzen.

Insgesamt konnte ein Wachstum von neun präsumtiven *C. perfringens* Sporen, auf den mCP – Medien, festgestellt werden.

Durch das Bedampfen mit Ammoniumhydroxid, konnten 100 %, der verdächtigen KBE, als *C. perfringens* Sporen identifiziert werden.

Die Reaktion, welche auf dem mCP – Medium stattgefunden hat, wurde bereits im Punkt 6.1 erläutert.

### 6.3 Nachweis von *C. perfringens* nach ISO 14189

Analog zum mCP – Verfahren wurden auch mithilfe der ISO 14189 die 77 Wasserproben auf das Vorhandensein von *C. perfringens* untersucht.

Dabei wurde das Bakterium in 43 Proben nachgewiesen. Das macht einen prozentualen Anteil von 55,84 % aus,

Insgesamt konnten 610 Kolonien gezählt werden, welche als *C. perfringens* verdächtig werden konnten.

Das im Nährboden enthaltene Ammoniumeisen(III)citrat und das Natriumdisulfit weisen die Produktion von Schwefelwasserstoff durch die Bakterien nach und bewirken gleichzeitig eine Schwarzfärbung der Kolonien. Die KBE, welche in der Lage sind den Schwefelwasserstoff zu produzieren, können durch ihre Schwarzfärbung, welche mit der Eisenreduzierung zu erklären ist, identifiziert werden. [5]

Durch das im TSC – Nähragar enthaltene D – Cycloserin, wird die Größe der wachsenden Kolonien klein gehalten, und ein das Auftreten möglicher Begleitflora gehemmt. [1]

Nach ISO 14189 wurden nur 218 Kolonien auf die Identität von *C. perfringens* untersucht. Nach Übertragung der KBE auf DEV – Agar und der anschließenden Inkubation, wurden die gewachsenen Kolonien mit saurer Phosphatase – Reagenz versetzt. Dabei konnte bei 190 KBE ein Farbumschlag, von cremefarben nach dunkelbraun, beobachtet werden.

Dieses Ergebnis zeigt das Vorhandensein des Enzyms saure Phosphatase. Falls die KBE, nach dem Versetzen mit der Reagenz, ihre Farbe behalten, wird das Enzym nicht nachgewiesen und das Koloniewachstum ist nicht auf *C. perfringens* zurückzuführen.

Auf dem mCP – Medium wurden 194 Kolonien, als *C. perfringens*, identifiziert.

Damit kann geschlussfolgert werden, dass in diesem Fall die Kontrolle, der untersuchten *C. perfringens* Kolonien, auf dem DEV – Agar und dem mCP – Agar, nahezu identisch sind.

Um die Ergebnisse des Verfahrens nach ISO 14189 am Ende mit dem mCP - Verfahren vergleichen zu können, mussten die bestätigten Kolonien, auf die Gesamtzahl an identifizierten KBE, hochgerechnet werden.

Somit konnten auf dem TSC – Medium von 610 verdächtigen Kolonien, ca. 521 Bakterienkolonien mithilfe des DEV - Agars nachgewiesen werden.

Das Ergebnis, welches die Hochrechnung der bestätigten Kolonien auf dem mCP – Medium ergab, weicht mit 525 identifizierten KBE nur geringfügig ab.

Der Vergleich der Prozentangaben zeigt, dass mithilfe des DEV – Agars 85,41 % und durch den mCP – Agar 86,01 % der Kolonien, als *C. perfringens* bestätigt werden konnten.

Der Unterschied ist so gering, dass von einem nahezu identischen Ergebnis gesprochen werden kann, welches unter gleichen Umgebungsbedingungen erreicht werden konnte.

### **6.3 Nachweis der *C. perfringens* Sporen nach ISO 14189**

Es wurden 17 Wasserproben, mithilfe der ISO 14189, auf *C. perfringens* Sporen untersucht.

Dabei konnten in neun Wasserproben das Vorhandensein von Sporen nachgewiesen werden. In den anderen acht Proben wurde kein Wachstum festgestellt.

Auf den neun TSC – Platten sind 18 KBE gewachsen, welche mit dem DEV – und dem mCP – Agar untersucht wurden.

Auf beiden DEV - Medium konnten 13 Kolonien (72,22%), als *C. perfringens* Sporen, bestätigt werden. Mit dem mCP – Kontrollmedium wurden 15 der 18 (83,33%) untersuchten Kolonien als *C. perfringens* identifiziert.

### **6.4 Vergleich mCP – Verfahren und ISO 14189**

Beide Verfahren wurden unter den gleichen sterilen Bedingungen durchgeführt.

Das mCP – Verfahren konnte nach  $21 \pm 3$  h ein endgültiges Ergebnis für die Untersuchung der Wasserproben auf *C. perfringens* vorweisen.

Dagegen konnten mithilfe ISO 14189 Verfahrens nach  $21 \pm 3$  h nur verdächtige Kolonien beobachtet werden. Es waren weitere  $21 \pm 3$  h nötig, um die Identifizierung der KBE abschließen zu können.

Wenn die Ergebnisse beider Verfahren miteinander verglichen werden, ist festzustellen, dass mithilfe der mCP – Methode 45 Wasserproben positiv auf das Vorhandensein von *C. perfringens* getestet werden konnten.

Das ISO 14189 Verfahren konnte 43 Proben positiv auf *C. perfringens* testen.



Der Unterschied beider Methoden ist in diesem Fall sehr gering und kann keinerlei Aussagen darüber treffen, welches Verfahren geeigneter, für die Untersuchung auf das Vorkommen dieses Bakterium, ist.

Des Weiteren kann aus der im Anhang beigelegten Tabelle entnommen werden, dass bei 64 Proben sowohl durch das mCP – Verfahren, also auch durch die ISO 14189 ein gleiches Ergebnis erzielt werden konnte. Das heißt, dass entweder ein Wachstum auf den Nährmedien festgestellt wurde oder nicht. Die Übereinstimmung ist mit 83,12 % als sehr hoch anzusehen.

Ein etwas größerer Unterschied ist bei den präsumtiven Kolonien zu erkennen, welche auf den jeweiligen Medien gewachsen sind.

Auf dem mCP – Medium konnte ein Wachstum, von 791 verdächtigen Kolonien, beobachtet werden. Der TSC – Agar wies dagegen ein Koloniewachstum von 610 verdächtigen.

Diese Zahlenwerte geben noch keine Auskunft über die letztlich positiven *C. perfringens* Kolonien. Es kann vermutet werden, dass die beiden Medien das Auftreten von unerwünschter Begleitflora unterschiedlich stark hemmen und somit das Wachstum von *C. perfringens* beeinträchtigen.

Nachdem die verdächtigen Bakterienkolonien in den einzelnen Schritten weiter analysiert wurden, konnten, mithilfe des mCP – Verfahrens, 673 Kolonien als *C. perfringens* identifiziert werden. Prozentual gesehen, entspricht das einem Anteil von 85,08%.

Ein nahezu identisches Ergebnis konnte die Identifizierung, der verdächtigen Kolonien, durch die ISO 14189 aufzeigen.

Die Hochrechnung der bestätigten Kolonien ergab eine Gesamtanzahl von 521 Kolonien (85,41%), welche mithilfe des DEV – Agars, als *C. perfringens* nachgewiesen, werden konnten.

Diese zwei Prozentangaben geben Aufschluss darüber, dass keines der beiden Verfahren schlechter oder besser ist, als das andere.

Der Nachweis auf Sporen, in den Wasserproben, zeigte einen etwas größeren Unterschied zwischen beiden Verfahren.

In sechs Proben konnten, mithilfe des mCP – Verfahrens, Sporen nachwiesen werden. Dagegen wurden neun Proben, durch das TSC – Verfahren, positiv auf Sporen getestet. Dieser Unterschied kann dadurch entstanden sein, dass die Proben vor der Membranfiltration nicht ordnungsgemäß geschüttelt wurden und die enthaltenen Sporen sich nicht richtig verteilen konnten bzw. sich an der Innenwand der Probefalschen anhefteten.

Auf dem mCP – Agar sind neun verdächtige Kolonien gewachsen, welche zu 100 % als *C. perfringens* Sporen bestätigt werden konnten.

Mithilfe des TSC – Verfahrens konnten 18 verdächtige Kolonien nachgewiesen werden, von denen 13 (72,22%) *C. perfringens* Sporen waren.

Statistisch gesehen, gibt es keinen großen Unterschied zwischen beiden Verfahren. Es konnten annähernd die gleiche Anzahl an Wasserproben positiv, auf das Vorhandensein des Bakteriums *C. perfringens*, getestet werden.

Jedoch ist der Nachweis der sauren Phosphatase, nach ISO 14189, nicht ganz ungefährlich. Die Substanz Echtblausalz B, welche für die Zusammensetzung der sauren Phosphatase – Reagenz benötigt wird, ist giftig und besitzt eine krebserregende Wirkung. [1]; [Schneider, S. (2015)]

Ein weiterer Nachteil der ISO 14189 Methode ist, dass die Untersuchung  $21 \pm 3$  h länger dauert als die mCP – Methode. Das mCP – Verfahren ist deshalb auch das bessere Schnelltestverfahren, um Wasserproben auf das Vorkommen von *C. perfringens* zu überprüfen.

Das in manchen Wasserproben keine *C. perfringens* Bakterien nachgewiesen werden konnten, ist auf die gute Qualität der Talsperrenwässer und auf den Zeitpunkt der Probenahme zurückzuführen.

Die Wasserqualität ist auf die Höhe der Entnahmestellen zurückzuführen. Damit wird sichergestellt, dass für die Trinkwasseraufbereitung nur das qualitativ hochwertigste Rohwasser genutzt wird. Die Höhe der Entnahmestellen ist abhängig von den Umweltfaktoren und Jahreszeiten. [URL - 8]

## **7 Zusammenfassung und Ausblick**

Mithilfe der Arbeit wird gezeigt, dass das Bakterium *C. perfringens* mit den Verfahren nach TrinkwV 2001 und nach ISO 14189 in Wasserproben nachgewiesen werden kann. Das Prinzip beider Methoden kann als übereinstimmend angesehen werden, auch wenn die Durchführung nicht identisch durchgeführt wird.

Ein Nachteil der ISO 14189, gegenüber der mCP – Methode, ist die Dauer des Tests. Dadurch, dass die verdächtigen Kolonien ein zweites Mal inkubiert werden müssen, dauert der Test  $21 \pm 3$  h länger als das mCP –Verfahren.

Die längere Inanspruchnahme nimmt jedoch keinen Einfluss auf die Qualität bzw. das Wachstumsverhalten der Kolonien.

Das Verfahren nach der TrinkwV 2001 eignet sich eher für eine schnelle Untersuchung auf *C. perfringens* in Wasserproben.

Die Brauchbarkeit der Kolonien, welche auf dem TSC – Medium wachsen kann durch das Alter und die Lagerung der Platten beeinträchtigt werden.

Je älter das Medium ist, desto schlechter ist die Farbentwicklung der Bakterienkolonien auf dem Agar. Somit ist es schwieriger präsumtive *C. perfringens* Kolonien von anderen Bakterienkolonien unterscheiden zu können.

Ein weiteres Problem der ISO 14189 ist der Einsatz der krebserregenden Substanz Echtblausalz B, welche für die Laboranten gesundheitsschädlich sein kann.

Der Nachweis der sauren Phosphatase Aktivität kann daher bei der mCP – Methode als sicherer bezeichnet werden, da keine gefährlichen Chemikalien zum Einsatz kommen. Deshalb sollte das Verfahren überarbeitet werden, um die Gesundheit der Menschen nicht zu gefährden.

Des Weiteren kann die saure Phosphatase Aktivität einfacher und schneller nachgewiesen werden, da innerhalb von 20 – 30 Sekunden ein positives oder negatives Ergebnis zu erwarten ist.

Mithilfe der ISO 14189 tritt kann ein positives oder negatives Ergebnis erst nach 3 – 4 Minuten beobachtet werden. Erschwerend, für den Nachweis, kommt hinzu, dass der Farbumschlag bei den KBE manchmal nur sehr schwach zu erkennen ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Ergebnisse, welche mit beiden Methoden erreicht wurden, sehr ähneln und gut vergleichbar sind. Beide Methoden sind für die Untersuchung von Wasserproben geeignet, wobei die Methode nach ISO 14189 umständlicher als das mCP – Verfahren ist.

Es ist nicht nötig, dass die Kontrolle der sauren Phosphatase auf dem DEV – und dem mCP – Nährmedium durchgeführt werden muss.

Für den Nachweis würde eine Methode reichen, da die Testergebnisse, in dieser Arbeit, gezeigt haben, dass beide Verfahren fast identisch in ihren Resultaten sind.

Unterschiede zwischen den Verfahren nach ISO 14189 und nach TrinkwV 2001 können auf natürliche Ursachen, wie die Ungleichverteilungen der Bakterien in den Proben oder auf das Wachstumsverhalten der KBE auf den Platten zurückgeführt werden.

Das Auftreten unerwünschter Begleitflora, kann die subjektive Wahrnehmung der Kolonien beeinträchtigen und zu Ungenauigkeiten bei der Auszählung führen.

Weitere Ungenauigkeiten der Ergebnisse können damit erklärt werden, dass es zu Problemen bei der anaeroben Inkubation gab.

Es kann durchaus vorkommen, dass die Anaero Gen – Päckchen nicht zu 100% ein anaerobes Milieu geschaffen und somit das Wachstum der Kolonien beeinflusst haben könnten.

## **Literaturverzeichnis**

### Quellen aus dem Internet:

URL – 1: (05.09.2015) *Trinkwasserepidemie in Milwaukee (USA)*.

URL: <http://www.waterquality.de/trinkwasser/TWCRYPTO.HTM>

URL – 2: (08.08. 2015) Dr. rer. nat. Geraldine Nagel:

*Symptome für Gasbranderkrankungen.*

URL: <http://www.onmeda.de/krankheiten/gasbrand-symptome-3123-4.html>

URL – 3: (25.07.2015) Wasser Wissen: *Oberflächenwasser*.

URL: <http://www.wasser-wissen.de/abwasserlexikon/o/oberflaechenwasser.htm>

URL – 4: (25.07.2015) Wasser Wissen: *Rohwasser*.

URL: <http://www.wasser-wissen.de/abwasserlexikon/r/rohwasser.htm>

URL – 5: (20.07.2015) Bundesinstitut für Risikobewertung: *Clostridien*.

URL: <http://www.bfr.bund.de/de/clostridien-54348.html>

URL – 6: (20.7.2015) Spektrum: *Clostridien*.

URL: <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/clostridien/14512>

URL – 7: (20.07.2015) Laborlexikon: *Clostridium perfringens*.

URL: [http://www.laborlexikon.de/Lexikon/Infoframe/c/Clostridium\\_perfringens.htm](http://www.laborlexikon.de/Lexikon/Infoframe/c/Clostridium_perfringens.htm)

URL – 8: (18.08.2015) Thüringer Fernwasserversorgung: *Qualität von Talsperren*.

URL:

[http://www.thueringerfernwasser.de/frontend/index.php?folder\\_id=56&ses\\_id=b6ea664bccdee6d750ccd0d03df3cc1b](http://www.thueringerfernwasser.de/frontend/index.php?folder_id=56&ses_id=b6ea664bccdee6d750ccd0d03df3cc1b)

Normen:

[1] DIN EN ISO 14189 (11/2013): *Water quality — Enumeration of Clostridium perfringens method using membrane filtration.*

[2] Trinkwasserverordnung 2001:

*Untersuchung von Wasserproben mit mCP – Verfahren*

Paper:

[3] Umweltbundesamt (2001): *Empfehlung zur Vermeidung von Kontaminationen des Trinkwassers mit Parasiten.*

[4] OXOID (1998): *Membran – Clostridium – Perfringens – Selektivnährboden.*

[5] Roth (2004): *Tryptose – Sulfite – Cycloserin Agar.*

[6] Acumedia (2011): *Clostridium perfringens Agar Base (9188).*

[7] Umweltbundesamt (2001): *Belastungen von Trinkwassertalsperren.*

Bücher:

Neumann, G. ; Feucht, H.H. ; Becher, W. ; Späth, M. (2010):  
*Gynäkologische Infektionen.* Springer Verlag

Rodloff, A.C. (2012): *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie.* Springer Verlag

Botzenhart, Konrad; Feuerpfeil, Irmgard (2008):  
*Hygienisch – mikrobiologische Wasseruntersuchung in der Praxis.*  
WILEY - VCH- Verlag

Hof, Herbert; Dörries, Rüdiger (2012): *Medizinische Mikrobiologie.* Thieme Verlag

Präsentationen:

Dr. Schneider, Steffen (2015): *Neue Referenzverfahren in der Trinkwasseranalytik für Escherichia coli, coliforme Bakterien und Clostridium perfringens*

Dissertationen:

Kehr, Lisa (2010):

*Vergleich dreier Pulsfeld-Gelelektrophorese-Protokolle zur Typisierung von Clostridium perfringens – Isolaten.*

Charité – Universitätsmedizin Berlin Dissertation

## Anhang



Abbildung 14: Bedampfung der verdächtigen Kolonien mit Ammoniumhydroxid

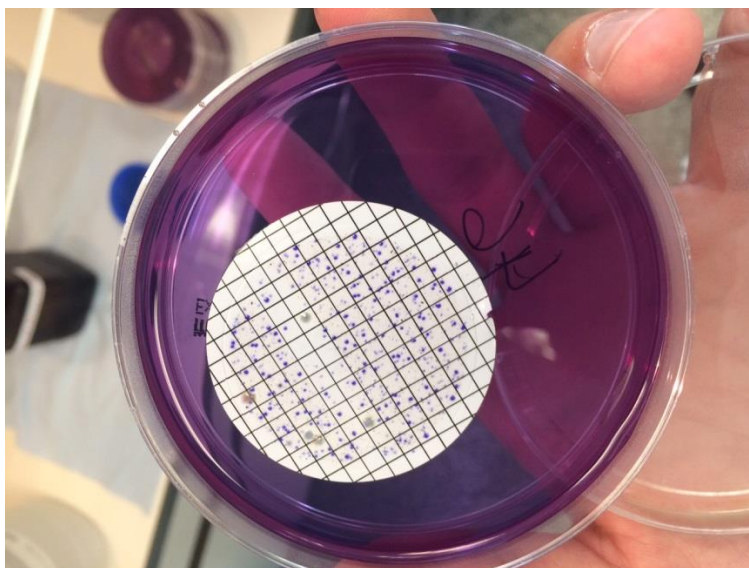
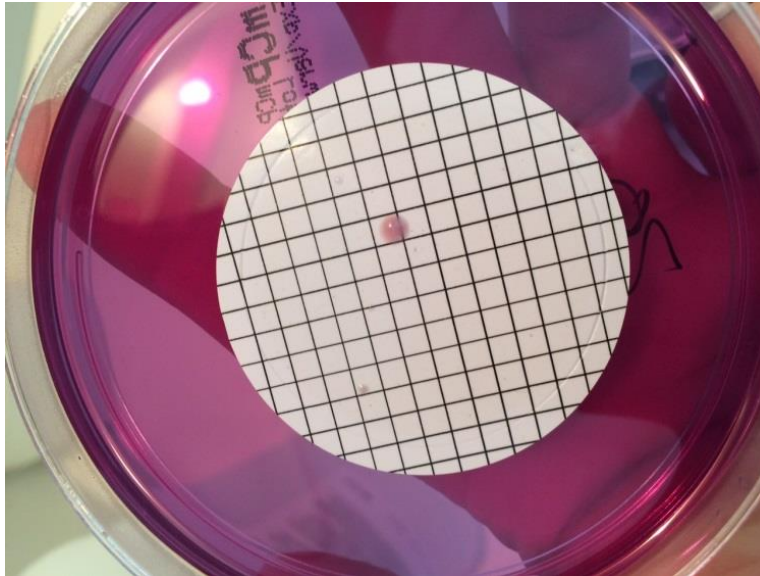
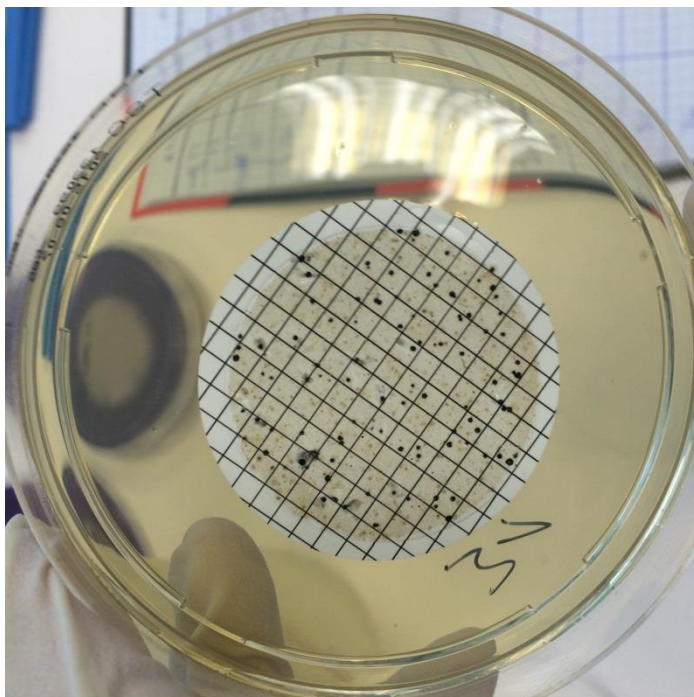


Abbildung 15: Negativer Nachweis auf *Clostridium perfringens*

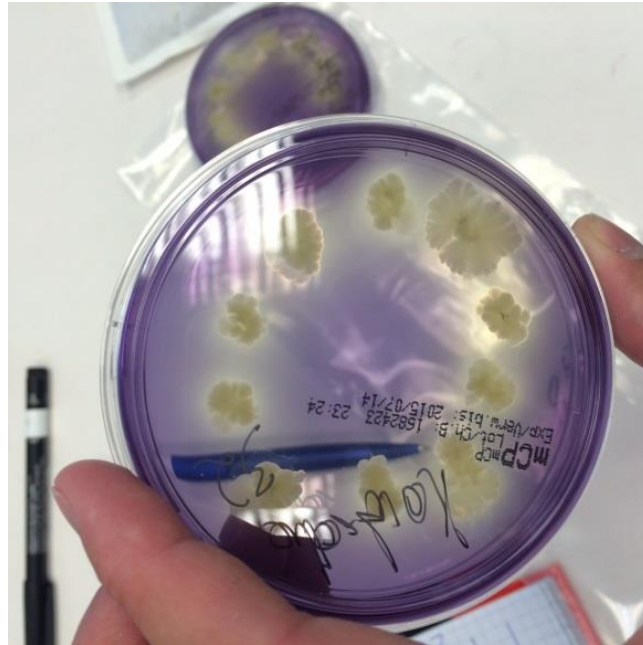




**Abbildung 16: Positiver Nachweis auf *Clostridium perfringens***



**Abbildung 17: Verdächtige *Clostridium perfringens* Kolonien auf TSC - Medium**



**Abbildung 18:** Positiver Nachweis der übertragenen Subkulturen von TSC - Medium auf mCP - Agar



**Abbildung 19:** Positiver Nachweis auf das Vorhandensein von saurer Phosphatase



Abbildung 20: Negativer Nachweis auf das Vorhandensein von saurer Phosphatase

Tabelle 7: Untersuchungsergebnisse

Nr.	Art der Probe	mCP (gewachsene Kolonien)	mCP (bestätigte Kolonien)	TSC (gewachsene Kolonien)	Untersuchte Kolonien		TSC (Bestätigte Kolonien)		Hochrechnung	
					DEV - Agar	mCP	DEV - Agar	mCP	DEV - Agar	mCP
1	RW	1	1	0	0	0	0	0	0	0
2	RW	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	RW	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	RW	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	RW	1	1	0	0	0	0	0	0	0
6	RW	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	RW	1	1	0	0	0	0	0	0	0
8	RW	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	RW	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	RW	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	RW	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	RW	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	RW	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14	RW	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	RW	1	1	0	0	0	0	0	0	0
16	RW	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	RW	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	RW	1	1	0	0	0	0	0	0	0
19	RW	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	RW	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	RW	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	RW	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	RW	0	0	2	2	2	2	2	2	2
24	RW	85	67	89	10	10	8	8	71,2	71,2
25	Zufluss	153	121	123	10	10	6	6	73,8	73,8
26	RW	1	1	0	0	0	0	0	0	0
27	RW	9	7	6	6	6	4	4	4	4
28	RW	7	5	2	2	2	2	2	2	2

29	RW	18	15	20	10	10	9	9	18	18
30	RW	4	2	5	5	5	4	4	4	4
31	RW	18	18	10	10	10	9	10	9	10
32	RW	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	RW	7	5	5	5	5	4	4	4	4
34	RW	3	3	4	4	4	0	4	0	4
35	RW	3	3	2	2	2	2	2	2	2
36	RW	6	6	6	6	6	6	6	6	6
37	RW	30	23	19	10	10	10	10	19	19
38	RW	2	2	2	2	2	2	2	2	2
39	RW	2	2	6	6	6	5	5	5	5
40	RW	51	44	52	10	10	10	10	52	52
41	RW	9	9	3	3	3	3	3	3	3
42	Zufluss	137	125	26	10	10	10	10	26	26
43	RW	84	67	23	10	10	10	10	23	23
44	RW	32	30	60	10	10	10	10	60	60
45	RW	50	45	49	10	10	10	10	49	49
46	RW	0	0	0	0	0	0	0	0	0
47	RW	0	0	2	2	2	2	2	2	2
48	RW	9	6	12	10	10	6	6	7,2	7,2
49	RW	6	6	6	6	6	5	5	5	5
50	RW	5	5	11	10	10	9	9	10	10
51	RW	1	1	1	1	1	1	1	1	1
52	Sporen	0	0	0	0	0	0	0	0	0
53	Sporen	0	0	4	4	4	2	2	2	2
54	Sporen	1	1	1	1	1	1	1	1	1
55	Sporen	0	0	0	0	0	0	0	0	0
56	Sporen	0	0	0	0	0	0	0	0	0
57	RW	18	18	18	10	10	10	9	18	16,2
58	RW	18	14	20	10	10	10	10	20	20
59	RW	1	1	1	1	1	1	1	1	1
60	RW	3	3	3	3	2	2	2	2	2
61	Sporen	0	0	0	0	0	0	0	0	0
62	Sporen	0	0	1	1	1	1	1	1	1
63	Sporen	0	0	1	1	1	1	1	1	1
64	Sporen	2	2	3	3	3	2	2	2	2
65	Sporen	1	1	3	3	3	3	3	3	3
66	Sporen	1	1	0	0	0	0	0	0	0
67	Sporen	0	0	0	0	0	0	0	0	0
68	Sporen	0	0	0	0	0	0	0	0	0
69	Sporen	2	2	1	1	1	1	1	1	1
70	Sporen	2	2	3	3	3	2	2	2	2
71	RW	1	1	1	1	1	1	1	1	1
72	Sporen	0	0	1	1	1	1	1	1	1
73	Sporen	0	0	0	0	0	0	0	0	0
74	RW	0	0	0	0	0	0	0	0	0
75	RW	1	1	0	0	0	0	0	0	0
76	RW	1	1	1	1	1	1	1	1	1
77	RW	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Gesamt	791	673	610	218	218	190	194	521	525

### **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, den 21 September 2015

Oliver Hauser